

**Die Amyloidablagerung in einem Mausmodell der Alzheimer
Demenz und die Modulation der β -Amyloid-Peptidentstehung
durch membranverankerte Inhibitoren**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät
für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Heinke Schieb
aus Hermannstadt

Dezember 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Labor für Molekulare Neurobiologie der Universität Duisburg-Essen, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, LVR-Klinikum, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Jens Wiltfang

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Michael Ehrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2011

Abkürzungsverzeichnis

1D	1-dimensional
2D	2-dimensional
% C	Anteil von Bisacrylamid an der Gesamtmenge des Acrylamidmonomers
% T	Konzentration der Gesamtacrylamidmonomere
A β	β -Amyloid
A β (1-42)	β -Amyloid mit der Aminosäure-Sequenz 1-42; analog: A β (1-37), A β (1-38), A β (1-39), A β (1-40), A β (2-40), A β (2-42), A β (3-40)
A β (N3pE)	β -Amyloid Peptid, das an Position 3 mit einem Pyroglutamat beginnt analog: A β (N11pE)
Abb	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
ADAM	‘a disintegrin and metalloprotease’
AICD	APP intrazelluläre Domäne
APP	Amyloid Vorläuferprotein
APP ^{sw}	Amyloid Vorläuferprotein mit der schwedischen Mutation
APP ^w	Amyloid Vorläuferprotein mit der Wildtyp-Sequenz
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BACE	‘ β -site APP cleaving enzyme’
BCA	Bicinchoninsäure
Bis	N,N’-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	(3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat)
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTF	C-terminales Fragment des Amyloid Vorläuferproteins
CTN	primäre Hühnertelencephalonkultur
D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
LDH	Lactatdehydrogenase
min	Minuten
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptions Ionisation
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
MW	Mittelwert
NDK	nicht demente Kontrolle
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
POD	Peroxidase
pI	isoelektrischer Punkt
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sAPP α	lösliches APP-Fragment nach α -Sekretase Schnitt
sAPP β	lösliches APP-Fragment nach β -Sekretase Schnitt
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TOF	Flugzeitanalysator ('time of flight')
TEMED	N,N,N,N'-tetramethylethyldiamin
v/v	Anteil Volumen pro Volumen (Volumen der Substanz in ml in 100 ml Lösung)
w/v	Anteil Gewicht pro Volumen (Masse der Substanz in g in 100 ml Lösung)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Proteolytische Prozessierung des APP Proteins.	14
Abb. 2: Intrazelluläre APP-Transportwege.	17
Abb. 3: Pathologische Punktmutationen im APP-Gen.	20
Abb. 4: Blotaufbau für den Proteintransfer von Bicine/Bis-tris/Tris/Sulfat Gelen.	37
Abb. 5: Fragmentierung eines Peptides nach Kollision.	44
Abb. 6: Quantifizierung von A β -Peptiden auf Blot-Membranen mit der QuantityOne Software.	50
Abb. 7: Altersabhängige relative Verteilung von A β (1-42) und A β (1-40) in Gehirnprouben von APP23 Mäusen.	51
Abb. 8: Unterschiede in den C-terminalen A β -Peptidvarianten zwischen Maus und Mensch.	53
Abb. 9: 2D-Auftrennungen von synthetischen A β -Peptiden, humanen AD-Proben und APP23 Maus Proben.	54
Abb. 10: A β (N3pE) ist reichlich in humanen Plaques, aber nur zu geringen Anteilen in APP23 Mäusen vorhanden.	56
Abb. 11: A β -Peptidmuster im CSF von APP23 Mäusen.	57
Abb. 12: Eine repräsentative 2DE der Ameisensäure-Fraktion einer 24 Monate alten APP23 Maus. .	58
Abb. 13: MS/MS-Analysen der A β (1-16) Peptide nach Lys-C-Verdau aus einer APP23 Ameisensäure-Fraktion.	61
Abb. 14: Identifizierung der Position der Modifikationen anhand der b-und y-Ionen im MS/MS Spektrum.	62
Abb. 15: Isoelektrische Fokussierung von synthetischen A β (1-16) Peptiden.	63
Abb. 16: Amyloid-Extraktion nach Pras eines Gehirns einer 24 Monate alten APP23 Maus.	65
Abb. 17: Reinigungsschritte zur Entfernung von A β -Peptid Kontaminationen.	68
Abb. 18: Untersuchung der Oberflächenabhängigkeit der A β -Peptid Verschleppung.	70
Abb. 19: Strukturaufbau der „Tripartite“ Substanzen.	71
Abb. 20: Effiziente Reduktion an A β -Peptiden durch „Tripartite“ Substanzen.	74
Abb. 21: „Tripartite“ Substanzen reduzieren die C-termianlen A β -Peptidvarianten in gleichem Ausmaß.	75

Abb. 22: „Tripartite“ Substanzen reduzieren den β -Sekretase Schnitt.	76
Abb. 23: MTT- und LDH-Zellviabilitätstests mit „Tripartite“ Substanzen.	77
Abb. 24: Einfluss der Linkerlängen auf die Inhibition der A β 40 Sekretion durch „Tripartite“ Substanzen.....	78
Abb. 25: Dosis-Wirkungskurven für „Tripartite“ Substanzen mit Linkerlängen von 35 Å, 47 Å, 63 Å bzw. 89 Å.	79
Abb. 26: Strukturen von Lipid-Ankern, die in dieser Arbeit für die „Tripartite“ Substanzen eingesetzt wurden.....	81
Abb. 27: Einfluss der Lipid-Anker auf die Inhibition der A β 40 Sekretion durch „Tripartite“ Substanzen.....	81
Abb. 28: Effekt der „Tripartite“ Substanzen auf das A β -Peptidmuster aus CTN.	82
Abb. 29: Optimierung der Trenngelmatrix zur verbesserten Auftrennung N-terminal verkürzter A β - Peptide.....	83
Abb. 30: „Tripartite“ Substanzen haben differentielle Effekte auf die A β -Peptid Sekretion von APPwt oder APPsw exprimierenden Zellen.....	85
Abb. 31: Vereinfachte Darstellung der „Keim Theorie“ für die Aggregation von Amyloidfibrillen. ..	87
Abb. 32: Entstehung des Pyroglutamats aus dem Glutamat.....	89
Abb. 33: Wirkmechanismus der „Tripartite“ Substanzen mit einem BACE Inhibitor.....	95
Abb. 34: Ein Modell für die „Lipid Raft“ assoziierte APP-Prozessierung durch BACE.....	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenn-, Sammel- und Kammgels der Bicine/Bis-Tris/Tris/Sulfat Gele.	33
Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper für die Immundetektion von Western-Blots.	38
Tabelle 3: A β -Gesamtmenen im Gehirngewebe von APP23 Mäusen.	50
Tabelle 4: A β -Peptide im CSF von APP23 Mäusen und Vergleich zu humanen Werten.....	57
Tabelle 5: Identifizierte A β -Peptide und ihre relativen Molekularmassen (Mr) aus Ameisensäure-Fractionen von 24 Monate alten APP23 Mäusen.....	59
Tabelle 6: Geschätzte Mengen an nachweisbaren A β -Peptiden nach verschiedenen Reinigungsschritten.	69
Tabelle 7: Strukturen, Formeln und Molekularmassen (M) der „Tripartite“ Substanzen.	72
Tabelle 8: Kennzahlen der Dosis-Wirkungskurven mit „Tripartite“ Substanzen in SH-SY5Y Zellen.	80

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	11
1.1 Alzheimer Demenz.....	11
1.2 Molekulare Pathophysiologie der amyloiden Plaques.....	12
1.2.1 Zusammensetzung der amyloiden Plaques in AD.....	12
1.2.2 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins	13
1.2.2.1 Entstehung von A β -Peptiden	14
1.2.2.2 Charakterisierung der APP spaltenden Sekretasen	15
1.2.2.3 Subzelluläre Prozessierung von APP	16
1.2.3 „Lipid Rafts“ und APP-Prozessierung	18
1.2.3.1 Definition von „Lipid Rafts“	18
1.2.3.2 Einfluss von Cholesterol und „Lipid Rafts“ auf die APP-Prozessierung.....	18
1.2.4 Die zentrale Rolle von A β in der AD-Pathologie	19
1.2.4.1 Genetisch bedingte Formen der AD.....	19
1.2.4.2 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	21
1.2.4.3 Transgene Mäuse als AD-Modelle.....	21
1.3 AD Biomarker	22
1.4 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2 Chemikalien	24
2.1.3 Massenstandards und Peptide.....	25
2.1.4 Antikörper	25
2.1.5 Enzyme und Kits	26
2.1.6 Biologische Proben	26
2.1.7 Geräte	26
2.1.8 Software	27
2.2 Proteinbiochemische Methoden	27
2.2.1 Proteinextraktion aus Hirngewebe	27
2.2.2 Amyloid-Extraktion nach Pras	28
2.2.3 Negative Kontrastierung von Amyloidfibrillen	28
2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
2.2.5 Immunpräzipitation	29
2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.6.1 Glycin/Tris SDS-PAGE	31
2.2.6.2 Bis/Tris SDS-PAGE	32
2.2.7 2D Elektrophorese (2DE).....	34
2.2.8 Proteinase K Behandlung von IPG Streifenhaltern.....	36
2.2.9 Proteintransfer (Western-Blot).....	36
2.2.10 Immundetektion	38
2.2.11 Coomassiefärbung.....	39
2.2.12 Serva-Violett Färbung von IPG Streifen.....	40
2.2.13 Quantifizierung von Peptidbanden im Western-Blot.....	40
2.2.14 Electrochemiluminescence (ECL) Technologie.....	41

2.3 Massenspektrometrie.....	42
2.3.1 Extraktion der Peptide aus 2D-Gelen.....	42
2.3.2 Massenbestimmung durch Matrix-unterstützte Laserdesorptions Ionisations (MALDI) – Flugzeit-Massenspektrometrie	42
2.3.3 Lys-C Verdau von A β -Peptiden.....	43
2.3.4 Peptid Sequenzierung durch Tandem Massenspektrometrie (MS/MS)	43
2.4 Zellkultur	44
2.4.1 Kultivierung von SH-SY5Y Zelllinien	44
2.4.2 Primäre Hühnertelencephalonkulturen.....	44
2.4.3 Zellviabilitätsassays	46
2.4.3.1 MTT-Test	46
2.4.3.2 Lactat-Dehydrogenase-Test	46
2.4.4 Behandlung von Zellen mit potentiellen β -Secretase Inhibitoren.....	47
2.4.5 Zellernte und -lyse.....	47
2.4.6 Dosis-Wirkungskurven und EC ₅₀ Bestimmungen für Testsubstanzen	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Vergleichende Analysen der Amyloidpathologie in APP23 Mäusen	49
3.1.1 Semi-quantitative Bestimmung von A β -Peptiden anhand von Western-Blots	49
3.1.2 Altersabhängige Akkumulation von A β -Peptiden in APP23 Mäusen	50
3.1.3. Vergleich der A β -Peptidmuster in Amyloidablagerungen zwischen Mensch und Maus.....	52
3.1.3.1 C-terminale A β -Peptidvarianten	52
3.1.3.2 N-terminale Variationen des A β -Peptides	53
3.1.4 A β -Peptidmuster in CSF von APP23 Mäusen	56
3.1.5 Identifizierung der Haupt A β -Peptide aus APP23 Mausgehirnen durch Massenspektrometrie.....	57
3.1.6 Bestimmung der Position und der chemischen Modifikation der A β -Spots bei pI 4,7.....	60
3.1.7 Alternative Methoden zur Minimierung des Risikos von artifiziellen Proteinmodifikationen.....	64
3.1.7.1 Amyloid-Extraktion mit Reinstwasser	64
3.1.7.2 2DE ohne Harnstoff	64
3.2 Methodische Aspekte der 2DE: Kreuzkontaminationen durch A β -Peptide	66
3.2.1 Reinigungsverfahren für IPG-Streifenhalter nach A β -Kontamination	66
3.2.2 Einfluss des Oberflächenmaterials auf die A β -Adhäsion und -Aggregation.....	69
3.3 Modulation der A β -Peptid Sekretion mit einem membranverankerten β -Secretase Inhibitor.....	71
3.3.1 Aufbau der „Tripartite“ Substanzen.....	71
3.3.2 Wirkungen der „Tripartite“ Strukturen auf die APP-Prozessierung	73
3.3.2.1 „Tripartite“ Substanzen reduzieren die A β -Peptid Sekretion	73
3.3.2.2 „Tripartite“ Substanzen reduzieren den β -Secretase Schnitt	75
3.3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung mit „Tripartite“ Substanzen	76
3.3.3 Variationen der „Tripartite“ Strukturen: Einfluss von Lipidanker und Linkerlänge auf die A β -Sekretion	77
3.3.3.1 Bestimmung der optimalen Linkerlänge	77
3.3.3.2 Einfluss des Lipid-Ankers auf die Effektivität der „Tripartite“ Substanzen....	80

3.3.4 Vergleich der A β -Peptidmuster vor und nach Behandlung mit „Tripartite“ β -Sekretaseinhibitoren	82
3.3.4.1 Optimierung der Auftrennung N-terminal verkürzter A β -Peptide.....	83
3.3.4.2 A β -Peptid-Muster in APPwt versus APPsw exprimierenden Zellen	84
4 Diskussion	86
4.1 Akkumulation von A β -Peptiden in einem Mausmodell und Vergleich zu der Pathologie beim Menschen.....	86
4.2 Modifizierte A β -Peptide in humanen und APP23 amyloiden Plaques.....	88
4.3 A β -Peptide können Oberflächen abhängig aggregieren und zu Kreuzkontaminationen führen	92
4.4 Verminderung der A β -Peptid Sekretion durch optimierte Tripartite β -Sekretaseinhibitoren.....	94
5. Zusammenfassung.....	101
6. Ausblick.....	103
7. Literaturverzeichnis.....	105
8. Publikationen	120
9. Anhang	121

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

1 Einleitung

1.1 Alzheimer Demenz

Im Jahre 1906 stellte Alois Alzheimer in Tübingen die später nach ihm benannte Demenz mit ihren klinischen, sowie charakteristischen neuropathologischen Ausprägungen vor. Mehr als die Hälfte aller heutigen Demenzfälle sind auf eine Alzheimer Demenz (AD) zurückzuführen (Lobo et al., 2000). Als Hauptrisikofaktor gilt das Alter; in der Altersgruppe der 60 - 65jährigen liegt die Prävalenz der Demenz bei 1%, bei den über 85jährigen schon bei 10% - 35% (Lobo et al., 2000). So ist die AD, durch den drastischen Anstieg der Lebenserwartung im 20. Jahrhundert, immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher und gesundheitsökonomischer Interessen gelangt.

Bei heutigen AD Patienten werden die gleichen klinischen Symptome wie bei Alzheimers erster Patientin Auguste D. beobachtet: Progressive Gedächtnisverluste, Sprachstörungen, Desorientierung, weitere gestörte kognitive Funktionen und Verhaltensänderungen (Alzheimer, 1907; Maurer et al., 1997). Im Verlauf kann die Krankheit von Depression, Wahn und visuellen Halluzinationen begleitet werden (Kester und Scheltens, 2009). Neuropathologisch ist die Erkrankung durch Synapsendegeneration und Neuronenverluste im limbischen System und in den Assoziationskortex gekennzeichnet (Morrison und Hof, 1997), makroskopisch erkennbar durch eine Atrophie der betroffenen Hirnareale. Mikroskopisch sind zwei kennzeichnende Merkmale für die AD sichtbar, extrazelluläre amyloide Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel.

Amyloide Plaques enthalten aggregierte, fibrilläre Formen des β -Amyloid ($A\beta$) Peptides (Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985). Man unterscheidet zwischen diffusen und neuritischen Plaques. Letztere sind umgeben von dystrophen Neuriten, aktivierter Mikroglia und reaktiven Astrozyten (Selkoe, 2001). Diffuse Plaques hingegen haben eine amorphe Struktur, weisen keine neuritische Dystrophie auf und sind auch in nicht-typischen Hirnregionen und in Gehirnen älterer Menschen ohne kognitive Defizite zu finden. Man nimmt daher an, dass es sich hier um Vorläuferläsionen, sogenannte „präamyloide Ablagerungen“, handelt (Tagliavini et al., 1988; Yamaguchi et al., 1988).

Die neurofibrillären Bündel enthalten hauptsächlich 10 nm große gepaarte Filamente, die sich in Helices winden (Kidd, 1963; Terry, 1963). In geringen Mengen sind auch ungepaarte, gerade 10 - 15 nm große Filamente zu finden (Yagishita et al., 1981). Hauptbestandteil der Filamente sind aggregierte, hyperphosphorylierte Formen des Mikrotubuli bindenden Proteins Tau (Delacourte und Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986). Das

Auftreten der neurofibrillären Bündel korreliert mit dem Grad der kognitiven Einschränkungen. Darauf aufbauend wurden die sechs „Braak-Stadien“ zur Beschreibung des Schweregrads der Erkrankung eingeführt (Braak et al., 1993; Braak und Braak, 1991). Im Braak-Stadium 1 treten nur vereinzelt neurofibrilläre Bündel im entorhinalen Kortex auf, im Braak Stadium 5 und 6 sind sie in dem gesamten Hippokampus und dem angrenzenden Neokortex nachweisbar.

1.2 Molekulare Pathophysiologie der amyloiden Plaques

Unter dem Begriff der Amyloidose werden verschiedene Erkrankungen, darunter AD, zusammengefasst, die sich alle durch die Ablagerung von extrazellulärem, missgefaltenem fibrillärem Protein auszeichnen. Alle Amyloide, darunter auch A β , weisen folgende Charakteristika auf: Sie zeigen nach Kongorot-Färbung eine grüne Doppelbrechung im polarisierten Licht (Missmahl und Hartwig, 1953), lassen sich durch Thioflavin anfärben (Le Vine, 1993) und sind im Elektronenmikroskop als typische Fibrillen erkennbar. Die Amyloidfibrillen sind unverzweigt, zwischen 6 und 13 nm breit und haben eine antiparallele β -Faltblattstruktur (Cohen und Calkins, 1959).

1.2.1 Zusammensetzung der amyloiden Plaques in AD

Die Aggregate in den amyloiden Plaques bestehen je nach Plaque-Typ aus verschiedenen Formen des A β -Peptides. Diffuse Plaques enthalten fast ausschließlich A β -Peptide, die am C-Terminus an Position 42 der A β -Sequenz enden (A β 42). In neuritischen Plaques stellt A β 42 ebenfalls die hauptsächliche Form des A β -Peptides dar, man findet aber zusätzlich Ablagerungen von A β -Peptiden, die an Position 40 enden (A β 40) (Iwatsubo et al., 1994). Eine Amyloidablagerung in cerebralen Gefäßen, in Form einer Amyloid-Angiopathie ist ein häufiges Merkmal einer AD (Ellis et al., 1996). Diese Ablagerungen enthalten überwiegend A β 40 (Miller et al., 1993).

Die A β -Peptide in neuritischen Plaques zeigen eine starke Heterogenität an ihrem N-Terminus. Neben dem Aspartat an Position 1 konnten verschiedene N-terminal trunkierte Formen nachgewiesen werden (Masters et al., 1985; Miller et al., 1993; Roher et al., 1993). Des Weiteren können verschiedene Aminosäuren am N-Terminus modifiziert vorliegen. Die beiden Aspartate in Position 1 und 7 sind teilweise isomerisiert oder zu den D-Aspartaten racemisiert, was generell ein Zeichen für langlebige Proteine ist (Fonseca et al., 1999; Roher et al., 1993; Saido et al., 1996; Shapira et al., 1988). Die Glutamat-Reste in Position 3 und 11

im A β -Peptid können zu einem Pyroglutamat zyklisiert werden (A β (N3pE) bzw. A β (N11pE)). Diese Modifikationen erhöhen die Hydrophobizität des Peptides, machen es resistenter gegenüber dem Abbau durch Proteasen und führen zu einer stärkeren Aggregationsneigung (Schilling et al., 2006). Ein Großteil der A β -Peptide liegt in den neuritischen Plaques als A β (N3pE) vor. Je nach Untersuchungsmethode wurde diese Veränderung bei 20% - 50% der A β -Peptide gefunden (Kuo et al., 1997; Russo et al., 1997; Saido et al., 1995; Saido et al., 1996).

In amyloiden Plaques wurde eine Reihe verschiedenster mit Amyloid assoziierter Moleküle identifiziert, darunter Proteoglykane, Apolipoprotein E, Proteasen, Protease-Inhibitoren, Serum Amyloid P, Ubiquitin und verschiedene Metallionen (Atwood et al., 2002; Morgan et al., 2004). Für einige dieser Komponenten konnte gezeigt werden, dass sie die A β -Aggregation *in vitro* beeinflussen können.

1.2.2 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins

A β -Peptide entstehen durch Proteolyse des Amyloid Vorläuferproteins (APP), eines hoch konservierten Typ I Transmembranproteins mit großer extrazellulärer Amino (N)-terminaler und kurzer cytosolischer Carboxy (C)-terminaler Domäne (Kang et al., 1987). APP wird ubiquitär exprimiert und es sind mehrere Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen (Zheng und Koo, 2006). Im Gehirn werden APP₆₉₅, APP₇₅₁ und APP₇₇₀ exprimiert, die nach der Anzahl der Aminosäuren des Genproduktes benannt sind. Die Funktion von APP im Gehirn ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch nimmt man an, dass es eine wichtige Rolle in der Synaptogenese und der synaptischen Plastizität spielt (Gralle und Ferreira, 2007).

Die Generierung von A β -Peptiden per se ist kein pathologischer Vorgang. Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde erkannt, dass Zellen kontinuierlich A β -Peptide sezernieren (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992) und sie unter physiologischen Bedingungen in biologischen Flüssigkeiten nachweisbar sind (Seubert et al., 1992). Dabei zeigte sich ein relativ stabiles Muster von C-terminal heterogenen A β -Peptiden, die in ihrer Länge zwischen 37 und 42 Aminosäuren variieren, wobei A β 40 die Hauptmenge darstellt (Lewczuk et al., 2004a; Wiltfang et al., 2002).

1.2.2.1 Entstehung von A β -Peptiden

Die Freisetzung der A β -Peptide geschieht nach sukzessiver proteolytischer Spaltung von APP durch zwei Enzymaktivitäten, den sogenannten Sekretasen. Dies geschieht analog zu der Spaltung von Notch im Notch-Signalweg.

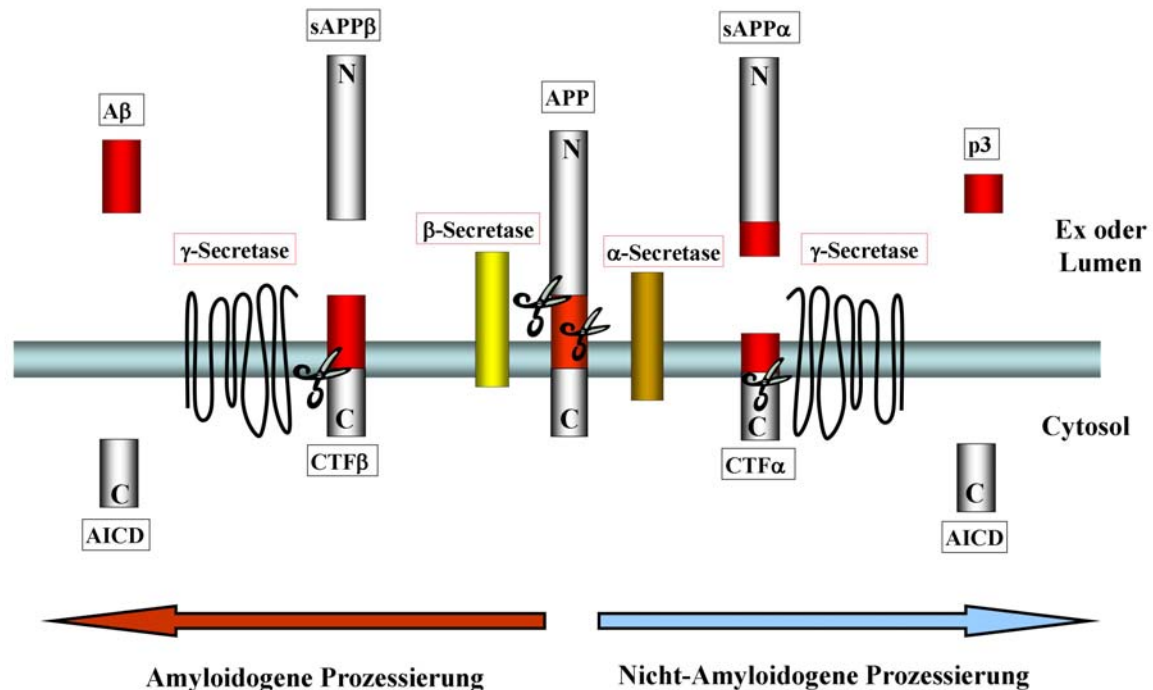


Abb. 1: Proteolytische Prozessierung des APP Proteins.

Nach Spaltung von APP durch β-Sekretase entsteht sAPPβ und das membranständige CTFβ (amyloidogene Prozessierung; linke Seite der Abb.). CTFβ wird durch die γ-Sekretase in der Transmembranregion gespalten, was zur Entstehung von Aβ-Peptiden und der cytosolischen AICD führt. Im nicht-amyloidogenen Weg (rechte Seite der Abb.) wird APP durch α-Sekretase gespalten und sAPPα und das membrangebundene CTFα werden gebildet. Die γ-Sekretase prozessiert CTFα zu den Fragmenten p3 und AICD. APP = Amyloid Vorläuferprotein; N: Amino-Terminus; C: Carboxy-Terminus; Ex: Extrazellulärraum; Lumen: Lumen von Organellen. sAPP: lösliches N-terminales APP-Fragment; CTF: C-terminales Fragment. AICD = APP intrazelluläre Domäne.

Im sogenannten „amyloidogenen“ Weg wird APP durch β- und γ-Sekretase gespalten (Selkoe, 2001) (Abb. 1). Die Spaltung durch β-Sekretase setzt N-terminal ein lösliches APP-Fragment (sAPPβ) frei und hinterlässt ein membrangebundenes C-terminales Fragment (CTFβ), das mit der ersten Aminosäure des Aβ-Peptides beginnt (Seubert et al., 1993). Nach Spaltung des CTFβ-Fragments durch die γ-Sekretase, werden Aβ-Peptide und die intrazelluläre APP-Domäne (AICD) freigesetzt. Die γ-Sekretase kann sukzessiv an mehreren Stellen schneiden, was zu der C-terminalen Heterogenität führt (Selkoe und Wolfe, 2007). Der größere Anteil des APPs wird jedoch durch die α-Sekretase prozessiert, durch die die

Fragmente sAPP α und CTF α entstehen (Abb. 1). Die Spaltung durch α -Sekretase schließt die Bildung von A β -Peptiden aus, da diese zwischen den Aminosäuren an Position 16 und 17 der A β -Region stattfindet (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Man spricht deshalb auch vom „nicht-amyloidogenen“ Weg. CTF α wird analog zum amyloidogenen Weg durch γ -Sekretase gespalten, wobei die Fragmente p3 und AICD freigesetzt werden.

1.2.2.2 Charakterisierung der APP spaltenden Sekretasen

Die bisher identifizierten Proteasen mit α -Sekretase Aktivität gehören zu der ADAM (‘a disintegrin and metalloprotease’) Familie (Asai et al., 2003), darunter ADAM10, ADAM17 und ADAM19 (Buxbaum et al., 1998a; Lammich et al., 1999; Tanabe et al., 2007). Neben der Spaltung von APP sind sie auch für die regulierte Proteolyse von E- und N-Cadherin, Notch, L-Selectin und dem Tumor Nekrose Faktor- α verantwortlich.

Mehrere Arbeitsgruppen identifizierten 1999 BACE1 (‘ β -site APP cleaving enzyme 1’) als die lang gesuchte Protease mit β -Sekretase Aktivität (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die Aspartatprotease BACE1 ist ein Typ I Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen katalytisch aktiven Domäne, die eine optimale Aktivität bei pH 4,5 besitzt. Neben der β -Schnittstelle am Aspartat in Position 1 kann BACE1 APP auch zwischen den Aminosäuren an Position 10 und 11 der A β Sequenz schneiden (Gouras et al., 1998). Sowohl die BACE1 mRNA als auch das Protein sind in großen Mengen im Gehirn und hier vor allem in Neuronen zu finden (Marcinkiewicz und Seidah, 2000; Vassar et al., 1999). In BACE knock-out Mäusen sind sowohl die β -Secretase Aktivität als auch die A β -Produktion drastisch reduziert (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001). Isolierte Neuronen aus diesen Mäusen produzieren nur noch ca. 7% der A β 40 Menge der Zellen aus entsprechenden Wildtyp Mäusen (Roberds et al., 2001). Diese Untersuchungen bestätigen die Annahme, dass BACE1 die hauptsächliche β -Sekretase ist, die im Gehirn APP spaltet. Die BACE1 knock-out Mäuse haben einen sehr subtilen Phänotyp, der zunächst nicht in seiner Gesamtheit erkannt wurde. Einige Mäuse sterben in den ersten Wochen nach der Geburt, die Überlebenden sind kleiner und hyperaktiver (Dominguez et al., 2005). BACE1 knock-out Mäuse weisen eine Störung der peripheren Myelinschicht auf, sie ist dünner und bildet sich erst mit Verzögerung aus (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). Neben APP ist die β -Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals ein weiteres BACE Substrat und BACE1 knock-out Mäuse zeigten Veränderungen in der Inaktivierung dieses Kanals (Dominguez et al., 2005). Neuregulin, in dessen Gen ein Polymorphismus entdeckt wurde,

der als Risikofaktor für Schizophrenie gilt, ist ebenfalls ein BACE Substrat. Im Einklang damit wurden bei BACE1 knock-out Mäusen Verhaltensänderungen beobachtet, die einem schizophrenen Phänotyp ähneln und durch Antipsychotika behandelt werden konnten (Savonenko et al., 2008).

BACE2, ein BACE1 Homolog, ist ebenfalls eine Aspartatprotease. Die Aminosäuresequenzen von BACE1 und BACE2 sind zu 64% identisch (Bennett et al., 2000). BACE2 spaltet APP jedoch in der A β -Region nach dem Phenylalanin 19 und dem Phenylalanin 20 und besitzt somit eine alternative α -Sekretase Aktivität (Fluhrer et al., 2002).

Die γ -Sekretase ist ein membranständiger Proteinkomplex aus vier Untereinheiten mit einer ungewöhnlichen katalytischen Aktivität: Die proteolytische Spaltung von APP erfolgt in der Lipiddoppelschicht. Die Aspartatprotease Presenilin, die katalytische Einheit der γ -Sekretase, benötigt für ihre Aktivität die Ko-Faktoren Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 (Edbauer et al., 2003). Je zwei Isoformen von Presenilin (Presenilin 1 und 2) und von Aph-1 (Aph-1a und Aph-1b) sind bekannt, so dass theoretisch mindestens vier verschiedene γ -Sekretase Komplexe entstehen können. Eine Vielzahl an γ -Sekretase Substraten ist bekannt, die unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen. Dazu gehören z.B. Zelldifferenzierung (Notch und Jagged), Zelladhäsion (E- und N-Cadherin, CD44 und Nectin-1 α) und Signaltransduktion (ErbB4 und p75 Neurotrophin Rezeptor) (Selkoe und Wolfe, 2007). Die zelluläre Bedeutung der γ -Sekretase wird durch den Phänotyp der Presenilin knock-out Mäuse deutlich. Die Mäuse sterben kurz nach der Geburt und besitzen schwere Defekte in der Skelett- und Gehirnentwicklung (Shen et al., 1997).

1.2.2.3 Subzelluläre Prozessierung von APP

Während des intrazellulären Transportes zur Zelloberfläche („sekretorischer Weg“) wird APP durch O- und N-Glykosylierungen, Sulfatierung und Phosphorylierung posttranslational modifiziert (Hung und Selkoe, 1994; Weidemann et al., 1989). Nur ein geringer Anteil des APPs verbleibt an der Plasmamembran, der Großteil wird aufgrund des zytoplasmatischen Internalisierungsmotifes YENPTY schnell wieder internalisiert und zu Endosomen transportiert (Chen et al., 1990). Von hier aus können die APP-Moleküle zum Trans-Golgi-Netzwerk gelangen oder zur Plasmamembran „recycled“ werden. Ein Teil des APPs gelangt in die Lysosomen und wird hier abgebaut (Thinakaran und Koo, 2008). Die APP Transportwege sind schematisch in Abb. 2 dargestellt.

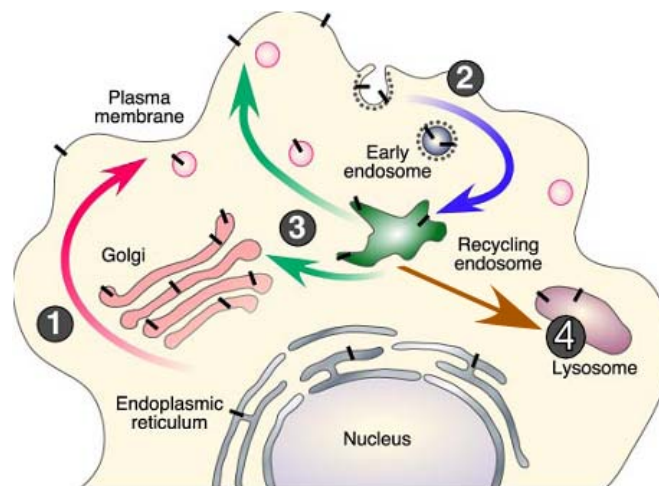


Abb. 2: Intrazelluläre APP-Transportwege.

APP-Moleküle sind als schwarze senkrechte Balken dargestellt. Sie werden im konstitutiv sekretorischen Weg über endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert (1). Während des Transports finden posttranslationale Modifikationen am APP-Molekül statt. Von der Plasmamembran wird APP wieder internalisiert und gelangt in endosomale Kompartimente (2). APP kann von Endosomen entweder direkt oder über den Golgi-Apparat wieder zur Plasmamembran transportiert werden (3). Alternativ kann APP in Lysosomen abgebaut werden (4). Abb. verändert nach Thinakaran und Koo, 2008.

Die Spaltung durch α -Sekretase findet an der Plasmamembran statt (Sisodia, 1992). Die genauen subzellulären Lokalisationen der β - und γ -Sekretase Spaltungen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die β -Secretase BACE1 ist vor allem in Endosomen und nur in geringen Mengen im Trans-Golgi-Netzwerk nachweisbar. Nach dem Transport zur Plasmamembran werden die BACE1 Moleküle schnell aufgrund eines Signalpeptides mit einem Dileucin-Motif endozytiert (Huse et al., 2000). Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer Studien zeigten eine starke Ko-Lokalisation von APP und BACE1 sowohl in frühen Endosomen, in denen das Enzym aufgrund seines sauren pH-Optimums aktiv ist, als auch an der Plasmamembran (Kinoshita et al., 2003). Die Lokalisation und Aktivität der γ -Sekretase wurde in vielen verschiedenen Kompartimenten nachgewiesen, zu denen endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Endosomen und Plasmamembran zählen.

Aufgrund der BACE1-Lokalisation und des sauren pH-Optimums nimmt man an, dass für die Entstehung der A β -Peptide endozytotische Kompartimente entscheidend sind (Small und Gandy, 2006; Thinakaran und Koo, 2008). Zudem wurde gezeigt, dass in Präsynapsen von Neuronen A β -Peptide in Endosomen generiert werden (Buxbaum et al., 1998b; Ikin et al., 1996; Marquez-Sterling et al., 1997; Small und Gandy, 2006)

1.2.3 „Lipid Rafts“ und APP-Prozessierung

Da sowohl APP als auch alle an seiner Prozessierung beteiligten Enzyme Membran-assoziiert sind, kann die Zusammensetzung der Membrankompartimente eine wichtige Rolle bei der Generierung von A β -Peptiden spielen. Entscheidend hierbei scheinen vor allem die sogenannten „Lipid Rafts“ zu sein.

1.2.3.1 Definition von „Lipid Rafts“

Membranen werden heute als Mosaik aus verschiedenen Mikrodomänen angesehen. Die „Lipid Rafts“ stellen eine Organisationsdomäne dar, indem sie Membranplattformen für Proteinsortierung und Signalkaskaden bilden (Helms und Zurzolo, 2004).

„Lipid Rafts“ sind höher geordnet und dichter gepackt als „Nicht-Raft“ Domänen der Membran. Im äußeren Blatt der Lipiddoppelschicht sind sie aus Cholesterol und Sphingolipiden (Sphingomyelin und Glycosphingolipide) zusammengesetzt, während sie auf der zytoplasmatischen Seite Cholesterol und Phospholipide enthalten (Simons und Ikonen, 1997). Die Entstehung der „flüssig geordneten“ Lipidphase, wie „Lipid Rafts“ auch charakterisiert werden, wird durch die vornehmlich gesättigten Fettsäurereste begünstigt. Lücken zwischen den Fettsäureresten werden durch Cholesterolmoleküle gefüllt, deren 3-Hydroxyl-Gruppe mit der Amidgruppe des Sphingolipid-Ceramidgerüsts interagiert, was zu einer Verstärkung der Assoziation führt (Simons und Ikonen, 1997). Zu den konstitutiven Raftproteinen gehören Proteine die Glycosylphosphatidylinositol verankert, doppelt acyliert oder mit Cholesterol verknüpft sind, sowie Transmembranproteine, die häufig palmitoyliert sind (Brown und London, 1998; Melkonian et al., 1999). Die Raft-Affinität von Proteinen kann reguliert werden. So kann die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor zu dessen Oligomerisierung und damit zur Erhöhung der Raft-Assoziation führen. Gezeigt wurde dies bei der Bindung von Immunglobulin (Ig) E an den F_C Rezeptor von Mastzellen (Sheets et al., 1999), sowie bei der Signalweiterleitung des T- und B- Zell Rezeptors (Janes et al., 2000). Eine reversible Palmitoylierung kann ebenfalls die „Lipid Raft“ Assoziation von Proteinen regulieren (Simons und Ehehalt, 2002).

1.2.3.2 Einfluss von Cholesterol und „Lipid Rafts“ auf die APP-Prozessierung

Eine Reihe unterschiedlicher Untersuchungen zeigte, dass Cholesterol eine Rolle bei der AD-Pathogenese und insbesondere bei der APP-Prozessierung spielt. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte Cholesterolwerte in mittleren Jahren mit dem Auftreten einer AD im hohen Alter korrelieren (Kivipelto et al., 2001; Notkola et al., 1998; Pappolla et

al., 2003). Retrospektive Studien an Patienten, die Cholesterol reduzierende Medikamente aus der Gruppe der Statine verabreicht bekamen, zeigten eine bis zu 70% erniedrigte Inzidenz von AD im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Prospektive Studien fielen jedoch widersprüchlich aus, der Effekt der Statine konnte je nach Studie widerlegt oder auch bestätigt werden (Buxbaum et al., 2002; Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Simons et al., 2002).

Sehr gut belegt hingegen ist die Wirkung von Cholesterol auf die Entstehung von A β -Peptiden in Zell- und Tierexperimenten. Eine cholesterolreiche Diät erhöhte in AD Mausmodellen die A β -Akkumulation (Li et al., 2003; Refolo et al., 2000; Shie et al., 2002), Statine hingegen konnten die Amyloidpathologie reduzieren (Fassbender et al., 2001; Refolo et al., 2001). Gleichzeitig wurde die Spaltung durch α -Sekretase beeinflusst: Cholesterinreiche Diät erniedrigte und Behandlung mit Statinen erhöhte die Bildung von sAPP α (Refolo et al., 2000; Refolo et al., 2001).

Ein signifikanter Anteil der Gesamtmenge an β - und γ -Sekretasen befindet sich in „Lipid Rafts“ (Cordy et al., 2003; Riddell et al., 2001; Wahrle et al., 2002). BACE1 wird an drei Cystein-Resten palmitoyliert, was seine Assoziation mit „Lipid Rafts“ erhöht (Benjannet et al., 2001). Diese Befunde machten sich Braxmeier et al. zunutze, um die Wirkung von β -Sekretase Inhibitoren zu verbessern. Sie entwickelten ein Konzept, bei dem das Inhibitormolekül (Pharmakophor) über einen Linker an einen Membran-Anker gekoppelt wurde (Braxmeier et al., 2005). Auf diese Weise sollte die lokale Inhibitor-Konzentration am Ort der β -Sekretasespaltung erhöht werden. Die effiziente Reduzierung von A β -Peptiden durch ein solches Verfahren konnte bestätigt werden (Rajendran et al., 2008).

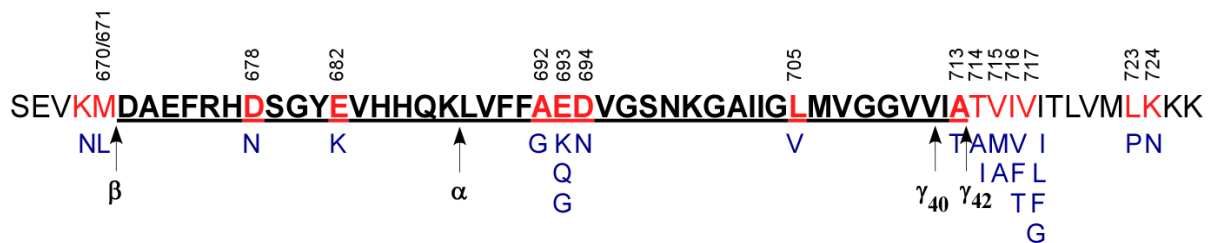
1.2.4 Die zentrale Rolle von A β in der AD-Pathologie

Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden mehrere Genmutationen identifiziert die autosomal dominante familiäre Alzheimer Demenz (FAD) auslösen. Die Tatsache, dass alle Proteine, die von diesen Genen codiert werden, einen Zusammenhang zu der Amyloidpathologie aufweisen, ist eines der zentralen Argumente für die sogenannte Amyloid-Kaskaden-Hypothese.

1.2.4.1 Genetisch bedingte Formen der AD

Es sind Punktmutationen in drei Genen bekannt, die zu einer (FAD) führen: APP, Presenilin 1 und Presenilin 2. Obwohl nur bis zu ca. 0,5% aller Fälle von AD durch eine dieser

Auf dem auf Chromosom 21 liegenden APP Gen sind bisher 23 pathologische Punktmutationen bekannt, die entweder eine AD oder eine cerebrale Amyloid-Angiopathie auslösen. Die meisten der Mutationen liegen nahe der α -, β - oder γ -Sekretase Schnittstellen (Abb. 3). Die sogenannte schwedische Doppelmutation (269498 G>T, 269499 A>C; Aminosäurenaustausch KM→NL) vor der β -Sekretase Schnittstelle führt zu einer ca. 6fach erhöhten Sekretion von A β , die alle C-terminalen A β -Peptid Varianten betrifft (Cai et al., 1993). Die meisten der Mutationen nahe der γ -Schnittstelle erhöhen die relative Produktion von A β 42 Peptiden (De Jonghe et al., 2001; Kumar-Singh et al., 2000; Suzuki et al., 1994).



Ein Ausschnitt der APP Aminosäure-Sequenz (667 – 726; APP₇₇₀ Isoform) ist im Einbuchstaben-Kode dargestellt. Die Aβ-Sequenz 1-42 ist fett gedruckt und unterstrichen. Die Positionen, die von Mutationen betroffen sind, sind rot markiert. Unterhalb der Wildtyp Sequenz sind die bekannten Mutationen in blau gelistet, oberhalb sind die Positionen des Aminosäureaustausches angegeben. Die Pfeile zeigen die Schnittstellen der Sekretasen an. Eine Auflistung dieser und aller weiteren bekannten APP Mutationen befindet sich unter <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>.

Preseniline sind die katalytisch aktiven Komponenten des γ -Sekretasekomplexes. Es sind bis dato 136 pathologische Mutationen in den Presenilin 1 und 2 Genen auf Chromosom 14 bzw. 1 bekannt (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>), die zu einem frühen Auftreten der AD, zwischen 35 und 60 Jahren führen (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Die meisten Presenilin Mutationen bewirken eine Zunahme von A β 42 im Verhältnis zu A β 40 (Duff et al., 1996; Scheuner et al., 1996).

1.2.4.2 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese setzt die Bildung und Akkumulation von A β -Peptiden an den Beginn der pathologischen Vorgänge die zu einer AD führen (Hardy und Selkoe, 2002; Hardy und Higgins, 1992; Selkoe, 1991). Nach dieser Theorie führt eine Akkumulation von A β 42 Peptiden zu deren Oligomerisierung und Ablagerung in diffusen Plaques. A β Oligomere können Mikroglia und Astrozyten aktivieren und die Degeneration von Synapsen, als auch neuritische Verletzungen herbeiführen. Dies führt zu oxidativem Stress, Entzündung und einer neuronalen Dysfunktion. Dadurch werden Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten verändert, was eine Hyperphosphorylierung von Tau, dessen Funktionsverlust und schließlich die Aggregation zu neurofibrillären Bündeln bewirkt. Die Folgen sind ein Neuronenuntergang und das klinische Bild der Demenz (Hardy und Selkoe, 2002). Die definitive Bestätigung der Theorie, eine wirksame anti-Amyloid Therapie beim Menschen, steht jedoch noch aus.

1.2.4.3 Transgene Mäuse als AD-Modelle

Mehrere APP transgene Mauslinien wurden entwickelt, die bestimmte Aspekte der AD-Pathologie widerspiegeln. Die Expression von humanem APP mit einer FAD Mutation (s. Abb. 3), führt zu der Akkumulation und Ablagerung von A β -Peptiden im Gehirn dieser Mäuse (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997). In doppel-transgenen Mäusen, die neben mutiertem APP auch Presenilin 1 mit einer FAD Mutation exprimieren, ist ein früheres Auftreten der A β -Ablagerungen zu beobachten (Holcomb et al., 1998; McGowan et al., 1999; Radde et al., 2006).

In einigen Aspekten haben sich APP transgene Mäuse als gute AD-Modelle erwiesen. In ihren Gehirnen akkumulieren altersabhängig A β -Peptide, es bilden sich amyloide Plaques aus und Degenerationen an Synapsen und Dendriten treten auf (Duyckaerts et al., 2008). Sie zeigen auch Anzeichen einer Neuroinflammation, dies jedoch in geringerem Ausmaß als bei der humanen Pathologie beobachtet wird (Schwab et al., 2004). Trotz der Gemeinsamkeiten zur AD-Pathologie sind diese Modelle unvollständig. So zeigen APP-transgene Mäuse keine Atrophie und keine oder nur geringfügige neuronale Zellverluste (Calhoun et al., 1998; Irizarry et al., 1997). Der auffälligste Unterschied ist das Fehlen von neurofibrillären Bündeln. Zwar konnten hyperphosphorylierte Formen des Tau-Proteins in einigen APP-transgenen Mäusen nachgewiesen werden, jedoch nie die für die AD typischen fibrillären, gepaarten Filamente. Dies konnte durch eine doppel-transgene Maus erreicht werden, die neben

humanem mutiertem APP auch humanes Tau mit einer Mutation für Frontotemporale Demenz exprimiert (Lewis et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung der Amyloidpathologie die etablierte Mauslinie APP23 verwendet. In der APP23 Maus wird humanes APP₇₅₁ mit der schwedischen Doppelmutation (K670N/M671L) unter der Kontrolle des neuronenspezifischen murinen Thy-1 Promoters exprimiert (Sturchler-Pierrat et al., 1997). APP23 Mäuse zeigen ab einem Alter von ca. 6 Monaten erste Zeichen einer Amyloidablagerung. Die Anzahl und Größe der Plaques nimmt mit dem Alter zu, im Alter von 24 Monaten sind Neokortex und Hippokampus der APP23 Mäuse übersät mit amyloiden Plaques. Die Plaques sind assoziiert mit hypertrophen Astrozyten, aktivierter Mikroglia und dystrophen Neuriten, die hyperphosphoryliertes Tau enthalten (Sturchler-Pierrat et al., 1997). APP23 Mäuse weisen zudem Amyloidablagerungen in cerebralen Gefäßen auf, so dass sie sich auch als Modell für eine cerebrale Amyloid-Angiopathie eignen (Calhoun et al., 1999).

1.3 AD Biomarker

Ein Biomarker ist ein objektiv messbares Merkmal, das als Indikator für einen biologischen Prozess, einen pathologischen Prozess oder eine pharmakologische Wirkung eines therapeutischen Eingriffs dient (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Für die Differentialdiagnose von neuropsychiatrischen Krankheiten wurden A β 42, Gesamt-Tau und phosphoryliertes Tau in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) in einer Vielzahl von großen, unabhängigen Studien als AD-Biomarker bestätigt. CSF eignet sich besonders für die Messung von Biomarkern, da es im direkten Kontakt mit dem Extrazellulärraum des Gehirnes steht und somit biochemische Veränderungen des Gehirns abbilden kann. Sowohl die Konzentration an Gesamt-Tau, als auch an phosphoryliertem Tau ist in AD-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen erhöht (Ishiguro et al., 1999; Mori et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995). Tau ist jedoch kein spezifischer Marker, sondern spiegelt vielmehr generell einen Untergang von Neuronen wider (Hesse et al., 2000). A β 42 ist im CSF von AD-Patienten um bis zu 50% erniedrigt, während die A β Gesamtmengen sich nicht signifikant von den Kontrollgruppen unterscheiden (Lewczuk et al., 2004b; Motter et al., 1995; Sunderland et al., 2003). Da A β 40 unverändert bleibt, erlaubt das Verhältnis A β 42/40 eine bessere Diagnose für Patienten mit sehr hohen oder sehr niedrigen A β -Werten, die andernfalls nicht erkannt bzw. falsch positiv bewertet werden (Lewczuk und Wiltfang, 2008).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist das A β -Peptid bzw. dessen oligomere oder fibrilläre Formen ursächlich an der Entstehung der AD beteiligt. Für die Untersuchung der Mechanismen, die zur Akkumulation von A β -Peptiden und der Ausbildung von Plaques führen, haben sich unter anderem transgene Mausmodelle, die APP mit einer FAD Mutation überexprimieren, etabliert.

In dieser Arbeit sollte in einem ersten Teilprojekt die Amyloidablagerungen der transgenen Mauslinie APP23 biochemisch untersucht werden und mit humanen Gehirnen von AD-Patienten verglichen werden. Es sollte geklärt werden ob in den Gehirnen und im CSF der Mäuse Unterschiede in der Zusammensetzung der A β -Peptide, vor und nach dem Beginn der Ausbildung von Plaques, auftreten. In humanen amyloiden Plaques wurde eine Vielzahl von modifizierten A β -Peptiden identifiziert. Diese A β -Peptidvarianten, weitere mögliche posttranslationale Modifikationen und deren Verteilung in verschiedenen löslichen Fraktionen sollten im Detail in den Mäusen analysiert werden. Desweiteren sollte eine neue Extraktionsmethode für A β -Plaques etabliert werden, in der auf aggressive Chemikalien weitgehend verzichtet werden kann.

In einem zweiten Teilprojekt sollte in Zellkulturen die Sekretion der A β -Peptide durch einen membranverankerten BACE Inhibitor moduliert werden. Da die β -Sekretase BACE die erste Spaltung bei der A β -Peptid Produktion katalysiert, ist sie ein geeignetes Zielenzym für die Entwicklung möglicher Therapieansätze. Die zu testenden Inhibitoren besaßen eine dreigliedrige modulare Struktur und ermöglichten durch den Austausch der Module eine selektive Anreicherung des Pharmakophors in bestimmten Membrankompartimenten. Zunächst sollten Variationen dieses Inhibitors sowohl in primären Zellen als auch in Zelllinien auf ihre biologische Aktivität getestet werden. Mit dem „optimierten“ Inhibitor sollte dann untersucht werden, inwieweit die A β -Peptid Sekretion durch die BACE Spaltung ausgelenkt werden kann und ob sich hier Unterschiede zwischen der APP Wildtyp-Sequenz und APP mit der FAD Mutation, die auch die APP23 Mäuse tragen, zeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Eier, befruchtet, White Leghorn	Charles River Laboratories, Sulzfeld
Einwegkanülen und -spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
Einwegskalpelle	Servoprax, Wesel
Filterpapier, extra dick	Biorad, München
Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran	Millipore, Schwalbach
IPG-Streifenhalter aus Aluminiumoxidkeramik	GE Healthcare, München
IPG-Streifenhalter aus Polystyrol	Biorad, München
IPG-Streifenhalter aus Teflon	Werkstatt Universitätsklinikum Essen
Zellkulturflaschen, -schalen und -platten, steril	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber, steril	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb, steril (73 µm Poren)	Corning, New York, USA

2.1.2 Chemikalien

Acrylamidfertiglösungen (Rotiphoresegel 40 bzw. 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, low melt	Carl Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bicine	biomol, Hamburg
Bis-Tris	biomol, Hamburg
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth, Karlsruhe
CHAPS	GE Healthcare, München
(3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO, Hybri Max [®] , steril	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare, München
Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
D-MEM/F12	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
L-Glutamine	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer	Biochrom, Berlin

Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
Hühnerserum	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hygromycin B	Invitrogen, Carlsbad, USA
Igepal CA 630 (Nonidet P40)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Immobiline Dry Strips	GE Healthcare, München
Iodoacetamid	GE Healthcare, München
MEM Non-Essential Amino Acids	Invitrogen, Carlsbad, USA
MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolin)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Neurobasal-A-Medium + B27 Supplemente	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE Novex [®] 4-12% Bis/Tris Gele	Invitrogen, Carlsbad, USA
Pharmalyte pH 3-10	GE Healthcare, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysin-Hydrobromid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
Proteaseinhibitorcocktail Complete Mini	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Calbiochem, Darmstadt
Roti-Block	Carl Roth, Karlsruhe
Serva-Violett 17	Serva, Heidelberg
Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex	GE Healthcare, München
N,N,N,N-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Ultra reine Chemikalien (PlusOne Reihe)	GE Healthcare, München

2.1.3 Massenstandards und Peptide

Magic Mark Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Precision Plus Protein Prestained Standard All Blue	Biorad, München
Synthetische A β -Peptide	Mobitec, Göttingen

2.1.4 Antikörper

Dynabeads M-280 Schaf anti-Maus IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA
-------------------------------------	---------------------------

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase konjugiert	Merck, Darmstadt
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase konjugiert	Merck, Darmstadt
Anti-humanes A β Maus IgG (1E8)	Bayer Schering Pharma AG, Berlin
Anti-humanes A β Maus IgG (6E10)	Covance, Emmerlyville, USA
Anti-humanes A β (N3pE) Ziege IgG	IBL, Hamburg
Biotinyliertes Pferd-anti-Maus IgG	Linaris, Bettingen

2.1.5 Enzyme und Kits

CytoTox 96 [®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, USA
ECL-plus ^T chemiluminescent	GE Healthcare, München
MSD [®] Human (6E10) Abeta 40 Kit,	Meso Scale Discovery,
MSD [®] Human (6E10) Abeta 3-Plex 38/40/42 Kit,	Gaithersburg, USA
MSD [®] sAPP α /sAPP β Multiplex Assay	
Trypsin/EDTA (0,5% / 0,2%w/v) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin

2.1.6 Biologische Proben

APP23 Proben (Gehirn und CSF)	Novartis Institutes for Biomedical Research, Basel, Schweiz
Humane Gehirnproben	Netherland Brain Bank, Amsterdam, Niederlande

2.1.7 Geräte

Brutgerät MP GTFS	Grumbach, Asslar
Digitalkamera Canon EOS 450D	Canon, Tokyo, Japan
Elektronenmikroskop LEO EM912	Zeiss, Oberkochen
Elektrophoresesystem: Mini-PROTEAN [®] Tetra-Cell	BioRad, München
Elektrophoresesystem: SE 260 Mini-Vertical Unit	GE Healthcare, München
Elektrophoresesystem: SE 600 Ruby TM	GE Healthcare, München
Ettan TM IPGphor TM 3 IEF System	GE Healthcare, München
Infinite [®] 200	Tecan, Salzburg, Österreich
Intas Imager	Intas, Göttingen
Magnetischer Separationsständer, MPC [®] M	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nanoquant plate TM	Tecan, Salzburg, Österreich
Sector TM Imager 6000	Meso Scale Discovery, Gaithersburg
SpeedVac Concentrator SPD121P	Thermo Fisher, Waltham, USA
Stereomikroskop, Leica MZ6	Leica, Heerbrugg, Schweiz

Ultraschallstab, Sonopuls, HD 2070 MS 72
 Werkbank, Hera safe KS 18
 Westernblot Apparaturen: Hoefer Semiphor
 Zentrifugen

Bandelin, Berlin
 Thermo Fisher, Waltham, USA
 GE Healthcare, München
 Eppendorf, Hamburg

2.1.8 Software

GraphPad Prism 5.01

GraphPad Software Inc., La Jolla,
 USA

Magellan

Tecan, Salzburg, Österreich

Protein Calculator v3.3

Christopher Putnam (www.scripps.edu/~cdputman/protcalc.html)

Quantity One®

BioRad, München

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinextraktion aus Hirngewebe

Die Proteinextraktion wurde bei 4°C durchgeführt. Pro 100 mg Feuchtgewicht wurden 1 ml Lysepuffer zugegeben und das Gewebe mit einem Ultraschallstab (2 x 30s, 70% power, 6 Zyklen) homogenisiert. Um Proteolyse und Dephosphorylierung zu verhindern wurden dem Lysepuffer Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zugesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (16 000 g, 30 Minuten (min), 4°C) erhielt man im Überstand die detergenzlöslichen Proteine. Das unlösliche Sediment wurde zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Um die schwer löslichen Plaque-Bestandteile zu extrahieren wurde es anschließend mit 150 µl 70% Ameisensäure pro 100 mg Ausgangsmaterial versetzt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt. Nach Zentrifugation (16 000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und im Vakuumkonzentrator getrocknet.

Lysepuffer

50 mM HEPES, NaOH, pH 7,4

150 mM NaCl

1% Igepal CA 630

0,5% Natriumdeoxycholat

0,1% SDS

Complete® Protease Inhibitor Cocktail

Phosphatase Inhibitor Cocktail

2.2.2 Amyloid-Extraktion nach Pras

Diese Methode wurde von Pras und Kollegen für die post mortem Extraktion von Amyloidfibrillen aus der Milz eines Patienten mit einer peripheren Amyloidose entwickelt (Pras et al., 1968). Sie zeichnet sich dadurch aus, dass keine aggressiven Chemikalien eingesetzt werden, sondern die Amyloidfibrillen in Reinstwasser extrahiert werden.

Das zu extrahierende Gewebestück wurde in einem Zentrifugenröhrchen in 3 ml eiskaltem „Pras-Puffer“ mit einem Ultraschallstab homogenisiert (2 x 30s, 70% power, 6 Zyklen). Das Homogenat wurde auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und 30 min bei 4°C und 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Sedimente in 1 ml „Pras-Puffer“ homogenisiert (1x 30s, 10% power, 6 Zyklen) und erneut zentrifugiert (16 000 g, 30 min, 4°C). Dieser Vorgang wurde sooft wiederholt bis sich die UV-Absorption bei 280 nm nicht mehr änderte. Die Absorptionsmessung im Tecan Reader erfolgte gegen den „Pras-Puffer“, dessen Absorptionswert von dem Messwert der Probe substrahiert wurde. Nach dem so alle in 150 mM NaCl löslichen Bestandteile extrahiert waren, wurde zu jedem verbliebenen Sediment 1 ml Reinstwasser gegeben, homogenisiert, 1 h bei 4°C, 16 000 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die H₂O-Extraktionen wurden wiederholt, bei den weiteren Extraktionsschritten wurde der Zentrifugationsschritt jedoch auf 30 min reduziert. Von den H₂O-Überständen wurde wiederum die Absorption bei 280 nm bestimmt und die Extraktion bei konstanten Absorptionswerten abgebrochen.

Pras-Puffer

150 mM NaCl

2 mM Tris-HCl, pH 7,5

Complete[®] Protease Inhibitor Cocktail

2.2.3 Negative Kontrastierung von Amyloidfibrillen

Bei der negativen Kontrastierung wird eine Probe auf einem Karbonträger adsorbiert und mit einem Schwermetallsalz versetzt. Dieses lagert sich um die Probenstruktur und erscheint im Elektronenmikroskop dunkel. So entsteht analog zur Fotografie ein Negativ.

Es wurden zwei Methoden für die negative Kontrastierung von H₂O-Fractionen nach Pras-Extraktion benutzt. Bei der ersten Variante wurde der H₂O-Extrakt 1:1 mit 0,2% Glutardialdehyd versetzt und 15 s auf einem mit Polyvinylformal beschichteten Elektronenmikroskopträger inkubiert. Nach Entfernung der Flüssigkeit mit einem Filterpapier wurde das Kontrastmittel, 2% Uranylacetat, zugegeben. Nach weiteren 15 s wurde die Lösung wieder mit einem Filterpapier aufgesaugt und der Träger getrocknet. Bei der zweiten Variante der

Methode wurden 9 µl des H₂O-Extraktes auf den Elektronenmikroskopträger pipettiert, mit 1 µl 100 mM CaCl₂ versetzt und 5 min inkubiert. Das Salz führte zum Ausfällen des in H₂O gelösten Amyloids. Als Kontrastmittel wurde anschließend Phosphorwolframsäure (1% (w/v), pH 5,7 mit NaOH eingestellt) eingesetzt. Der Träger wurde unter dem Elektronenmikroskop nach negativ gefärbten Strukturen abgesucht und entsprechend durch fotografische Aufnahmen dokumentiert.

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA) Assays kolorimetrisch bestimmt (Smith et al., 1985). Proteine bilden mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺-Ionen des Komplexes werden reduziert und bilden mit zwei Molekülen BCA einen violetten Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm proportional zur Proteinkonzentration ist. Reduktionsmittel können Cu²⁺-Ionen reduzieren und somit die Proteinbestimmung stören. Das im Zelllysepuffer enthaltene DTT wurde deshalb zuerst mittels Iodoacetamid umgesetzt (Hill und Straka, 1988).

Die Proteinbestimmung unbekannter Proteinlösungen erfolgte im Vergleich mit definierten Konzentrationen von BSA als Standard-Protein. Die Zelllysate und die BSA-Standards in Zelllysepuffer wurden 1:1 mit einer 20 mg/ml Iodoacetamid-Lösung in 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) versetzt. Die vollständige Umsetzung des Reduktionsmittels erfolgte 15 min bei 37°C. Die Gehirnextrakte wurden 1:200 in H₂O verdünnt und die entsprechende BSA-Standardreihe in 0,5% des Lysepuffers angesetzt. Pro Ansatz wurden 20 µl in eine Vertiefung einer Platte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Von den BSA-Standardproben wurden Dreifachbestimmungen, von den unbekannten Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl Nachweisreagenz (BCA-Lösung und 4% Kupfer(II)Sulfatlösung 50:1) wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 550 nm im Plattenphotometer (Infinite® 200) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Magellan Software, die die Proteinkonzentrationen der Standardlösungen graphisch gegen die Absorptionswerte aufträgt und eine Regressionsgerade berechnet. Aus deren Gleichung kann ausgehend von der gemessenen Absorption einer unbekannten Probe deren Proteinkonzentration berechnet werden.

2.2.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient zur Anreicherung oder Aufreinigung von Proteinen. Dazu wurden magnetische Mikropartikel verwendet, die kovalent mit einem anti-Maus-IgG vom

Schaf beschichtet sind. Zur Kopplung der Mikropartikel mit einem gegen das jeweilige Zielprotein gerichteten Maus-Antikörper wurde die Stammsuspension ($6-7 \times 10^8$ magnetische Mikropartikel pro ml = 10 mg/ml) in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und es folgten drei Waschschrte für 5 min mit folgendem Ablauf: Die Mikropartikel wurden kurz abzentrifugiert und 2 min mit offenem Deckel im magnetischen Separationsständer immobilisiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, mit 1 ml IP-Waschpuffer aufgefüllt und bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) geschüttelt. Die Kopplung des Antikörpers fand unter Schütteln (3 h, RT) mit 40 µg Antikörper pro ml der Mikropartikel Stammsuspension statt. Es folgten vier weitere Waschschrte (30 min, 4°C) und schließlich die Aufnahme der aktivierten Mikropartikel in IP-Waschpuffer / 0,02% (w/v) Na-Azid.

Für die IP wurden zu 800 µl der Probe 200 µl 5fach-IP-Detergenzpuffer und 25 µl der mit dem Antikörper gegen das Zielprotein gekoppelten magnetischen Mikropartikel gegeben und 15 h bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit IP-Waschpuffer für 5 min bei RT und anschließend ein Waschschrte mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (3 min, RT). Für die Elution des gebundenen Proteins von den Mikropartikeln, wurden diese 5 min bei 95°C in 25 µl Probenpuffer geschüttelt. Nach der Immobilisierung wurde der Überstand, der das immunpräzipitierte Protein enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

IP-Waschpuffer	0,1% (w/v) BSA in PBS
5x IP-Detergenz-Puffer	50 mM Hepes / NaOH pH 7,4 150 mM NaCl 0,5% (v/v) Nonidet P40 0,25% (w/v) Natriumdeoxycholat 0,05% (w/v) SDS 1x Complete® Protease Inhibitor Cocktail
Probenpuffer	0,36 M Bis-Tris 0,16 M Bicine 7,5% (w/v) Sucrose 1% (w/v) SDS 0,0075% (w/v) Bromphenolblau

2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Aufgrund ihrer positiven und negativen Ladungen wandern Proteine im elektrischen Feld. Ihre Wanderung hängt dabei von ihrer Nettoladung, Größe und Struktur ab. Ist eine Trennung nach der Proteingröße gewünscht, muss die Eigenladung der Proteine von einer stärkeren Ladung überlagert werden. Dazu wird den Proteinen das negativ geladene ionische Detergenz SDS zugegeben. Es denaturiert die Proteine, indem es mit seinem Fettsäureanteil an hydrophobe Regionen des Proteins bindet und bewirkt aufgrund seiner Ladung, dass Proteine während der Elektrophorese zur Anode wandern.

2.2.6.1 Glycin/Tris SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-PAGE in Gegenwart von Glycin und Tris angewendet (Lämmli, 1970). Es wurden 0,75 mm dicke Gele gegossen und als Elektrophoresesystem diente die Mini-PROTEAN[®] Tetra-Cell. Zunächst wurde das 7,5%ige Trenngel gegossen. Dazu wurden für eine 10 ml Gellösung 4,85 ml H₂O; 2,5 ml Trenngel-Puffer; 2,5 ml 30% T, 2,5% C (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 0,1 ml 10% (w/v) SDS; 40 µl 10% (w/v) APS und 10 µl TEMED gemischt, in eine Gelkammer gegossen und mit 70%igem Isopropanol überschichtet. Nach beendeter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt. Daraufhin wurde das Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel (5 ml Gellösung: 2,983 ml H₂O; 1,25 ml Sammelgelpuffer; 667 µl 30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid; 50 µl 10% (w/v) SDS; 40 µl 10% (w/v) APS und 10 µl TEMED) überschichtet und ein Kamm für das Probenvolumen luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation wurden die Gele in Gelkammern transferiert, die Kämme entfernt und die innere und äußere Kammer mit Lämmli-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit einem viertel Volumen des 4x Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V für ca. 1 h.

Lämmli-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
-----------------------	------------------------

Lämmli-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
------------------------	------------------------

Lämmli-Laufpuffer	0,25 M Tris
	0,192 M Glycin
	0,1% (w/v) SDS

4x Lämmli-Probenpuffer	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8
	40% (v/v) Glycerol
	8% (w/v) SDS
	4 mM DTT
	0,02% (w/v) Bromphenolblau

2.2.6.2 Bis/Tris SDS-PAGE

SDS-Gele mit Bis/Tris-Puffern wurden für die Auftrennung von kleinen Proteinen und Peptiden benutzt.

Die NuPAGE Novex[®] 4-12% Bis/Tris Gradientengele ermöglichen eine Auftrennung in einem breiten Bereich zwischen 2 und 200 kDa, was hilfreich für die Darstellung unterschiedlich großer APP-Spaltprodukte ist. Als Elektrophoresesystem wurde die SE 260 Mini-Vertical Unit mit dem MES-Laufpuffer benutzt und die Elektrophorese bei konstanten 120 V für ca. 90 min durchgeführt.

Für die Auftrennung von A β -Peptiden wurde das Bicine/Bis-tris/Tris/Sulfat Gelsystem (Wiltfang et al., 1991) verwendet. Mit der 8 M Harnstoff Version dieses Gelsystems können A β -Peptide mit verschiedenen C-Termini, die sich in ihrer Länge nur um ein bis zwei Aminosäuren unterscheiden, voneinander getrennt werden (Klafki et al., 1996). Vermutlich werden durch 8 M Harnstoff im Trenngel Konformationsänderungen induziert, die zu einer unterschiedlichen SDS-Beladung der Peptide führen, in Abhängigkeit von der Anzahl an hydrophoben Aminosäuren am Carboxy-Terminus des Peptides (Kawooya et al., 2003). Die Auftrennung erfolgt jedoch nicht mehr nach der Größe (die 4 kDa Peptide haben ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 10 kDa in 10%igen Gelen) und die längeren Peptide migrieren schneller als die kürzeren.

Es wurden je nach Fragestellung drei verschiedene Elektrophoresesysteme verwendet: Für Western-Blot Analysen wurde die Mini-PROTEAN[®] Tetra-Cell (Gelgröße 5,5 x 8,5 cm) benutzt und die Geldicke auf 0,5 mm reduziert um die Bandenschärfe zu verbessern. Für 2D-Gele wurde entweder die SE 260 Mini-Vertical Unit (Trenngelgröße 7,5 x 10 cm) oder die SE 600 RubyTM (15 x 15 cm Gelgröße) verwendet und die Geldicke auf 1,0 mm erhöht. Die Acrylamid-Konzentration im Trenngelpuffer entsprach 10%T 5%C. Für die Analyse von C-terminalen Varianten des A β -Peptides wurde Trenngelpuffer 1, für die von N-terminalen Varianten Trenngelpuffer 2 verwendet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Erniedrigung der H₂SO₄-Konzentration in Trenngelpuffer 2 eine bessere Auftrennung der N-terminalen Varianten erreicht werden konnte. Es wurden nacheinander drei Gele gegossen,

zuerst das Trenngel, das nach Polymerisation mit 250 µl Sammelgel überschichtet wurde und zuletzt das Kammgel, in das ein Kamm eingesetzt wurde. Die Zusammensetzung des Trenn-, Sammel- und Kammgels ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Innere der Gelkammern wurde mit Kathodenpuffer, der äußere Bereich mit Anodenpuffer befüllt. Für Gele, die 8 M Harnstoff im Trenngel enthielten, wurde Kathodenpuffer 1 mit 0,25% SDS verwendet, für Gele ohne Harnstoff Kathodenpuffer 2 mit einer SDS-Konzentration von 0,1%. Die Gelelektrophorese wurde für eindimensionale (1D)-Gele bei konstantem Strom von 25 mA/Gel 50 min durchgeführt. Bei zweidimensionalen (2D)-Gelen wurde die Elektrophorese bei 15 mA/Gel begonnen, nach 10 min auf 25 mA/Gel und nach weiteren 10 min auf 35 mA/Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde abgestoppt nach dem die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenn-, Sammel- und Kammgels der Bicine/Bis-Tris/Tris/Sulfat Gele.

Trenngel	8M Harnstoff 10%T 5%C	15%T 5%C	Sammel-/Kammgel (6%T 3%C)	Sammelgel	Kammgel
Harnstoff [g]	4,8	-	Sammelgelpuffer [ml]	2	-
Trenngelpuffer [ml]	2,5	2,5	Kammgelpuffer [ml]	-	2
Rotiphoresegel 40 (19:1)* [ml]	2,5	3,75	Rotiphoresegel 40 (29:1)** [ml]	0,6	0,6
10% SDS [ml]	0,25	0,1	1% SDS [ml]	1,0	1,0
70% Glycerol [ml]	-	2,49	H ₂ O [ml]	0,4	0,4
H ₂ O [ml]	1,01	1,12	1% Bromphenolblau [µl]	-	10
APS [µl]	40	40	APS [µl]	21	24
TEMED [µl]	5	5	TEMED [µl]	7	8
Endvolumen [ml]	10	10	Endvolumen [ml]	4	4

*: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40%T/5%C. **: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40%T/3%C

MES-Laufpuffer

50 mM MES

50 mM Tris, pH 7,3

0,1% (w/v) SDS

Trenngelpuffer 1

1,6 M Tris

0,4 M H₂SO₄

Trenngelpuffer 2

1,6 M Tris

0,3 M H₂SO₄

Sammelgelpuffer	0,8 M Bis-Tris 0,2 M H ₂ SO ₄
Kammgelpuffer	0,72 M Bis-Tris 0,32 M Bicine
Anodenpuffer	0,2 M Tris 0,05 M H ₂ SO ₄
Kathodenpuffer 1	0,2 M Bicine 0,1 M NaOH 0,25% SDS
Kathodenpuffer 2	0,2 M Bicine 0,1 M NaOH 0,1% SDS

2.2.7 2D Elektrophorese (2DE)

In der 2DE werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrer Ladung und in der zweiten Dimension nach ihrem Laufverhalten während der SDS-PAGE aufgetrennt. Man kann hiermit eine Vielzahl von Proteinen voneinander trennen und Proteinmodifikationen erkennen, die die Ladung des Proteins beeinflussen. Zuerst werden Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt (pI) fokussiert. Proteine sind amphotere Moleküle, die je nach dem vorherrschenden pH-Wert positiv, negativ oder ungeladen sein können. Der pI gibt den pH-Wert an, an dem die Nettoladung eines Proteins null ist und es sich in einem elektrischen Feld nicht mehr bewegt. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) werden Gelstreifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) benutzt, in den die Probe eingesaugt wird (Görg et al., 1988). Wird ein Strom angelegt wandern die Proteine in dem IPG-Streifen bis zu ihrem pI.

Die IPG Elektrofokussierung wurde in einem Ettan™ IPGphor™ III IEF System durchgeführt. Für die Protein Beladung wurde die „In-Gel Rehydrierungs Methode“ gewählt. Lag die Probe als Sediment oder eingetrocknet vor, wurde sie direkt in Rehydrierungslösung gelöst. War die Probe gelöst, wurde sie mit einer 1,2fach konzentrierten Rehydrierungslösung versetzt. Die Probe wurde dann tropfenweise auf die Oberfläche eines IPG-Streifenhalters pipettiert, auf den luftblasenfrei der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten aufgelegt wurde.

Um Verdunstungseffekte zu verhindern wurden die Gelstreifen mit Mineralöl überbeschichtet und abgedeckt. Die Rehydrierung erfolgte für 10 h passiv, d.h. ohne das Anlegen einer Spannung. Die folgenden Fokussierungsprogramme wurden angewendet:

- 1) 7 cm IPG-Streifen: 300 V 30 min, 800 V 30 min, 2000 V Gradient 1 h, 2000 V on Hold, Stop bei Σ 12-15 kVh.
- 2) 13 cm IPG-Streifen: 300 V 30 min, 500 V 30 min, 1000 V Gradient 1 h, 4000 V Gradient 1 h 30 min, 4000 V on Hold, Stop bei Σ 15-20 kVh.
- 3) 18 cm IPG-Streifen: 500 V 30 min, 1000 V Gradient 1 h, 8000 V Gradient 3 h, 8000 V on Hold, Stop bei Σ 30-40 kVh.

Nach der Fokussierung wurden die IPG Streifen in einem SDS-Puffer equilibriert, um sie für die Auftrennung der zweiten Dimension vorzubereiten. Dazu wurden sie zuerst 8 min bei RT in 1% (w/v) DTT in Equilibrierungspuffer und anschließend weitere 8 min in 4,8% (w/v) Iodoacetamid in Equilibrierungspuffer unter leichtem Schütteln inkubiert. DTT hält die denaturierten Proteine im reduzierten Zustand, Iodoacteamid alkyliert Thiol-Gruppen und schützt sie so vor der Reoxidierung während der Elektrophorese. Nach der Equilibrierung wurden die IPG-Streifen mit der aziden (+) Seite nach links, auf ein Polyacrylamidgel aufgelegt. Dieses wurde mit einer vorher auf 95°C erwärmten Agarose-Fixierlösung überschichtet. Rechts neben den IPG-Streifen wurde ein Teflon-Zahn eingefügt, um eine Tasche für einen 1D-Standard zu formen. Nach Verfestigung der Agarose-Fixierlösung wurde der Teflon-Zahn entfernt, die 1D-Standards aufgetragen und die Elektrophorese wie unter 2.2.6.2 beschrieben durchgeführt.

Rehydrierungslösung

8,3 M Harnstoff PlusOne
2% (w/v) CHAPS
20 mM DTT
0,5% (v/v) Pharmalyte pH 3-10

Equilibrierungspuffer

0,36 M Bis-Tris
0,16 M Bicine
6 M Harnstoff PlusOne
2% (w/v) SDS
20% (w/v) Glycerol

Agarose-Fixierlösung	1% (w/v) low melt Agarose
	0,36 M Bis-Tris
	0,16 M Bicine
	0,25% (w/v) SDS
	0,002% (w/v) Bromphenolblau

2.2.8 Proteinase K Behandlung von IPG Streifenhaltern

Die Behandlung mit Proteinase K ist durchzuführen wenn große Mengen an A β -Peptiden für die IEF bei der 2DE eingesetzt wurden, da die Gefahr von Kreuzkontamination besteht.

Die IPG-Streifenhalter wurden zunächst mit H₂O gespült, in der vom Hersteller empfohlenen Reinigungslösung über Nacht eingeweicht und mit einer Zahnbürste gereinigt. Anschließend wurden sie 10 min in 1% SDS aufgekocht. Die IPG-Streifenhalter wurden in eine feuchte Kammer gelegt, mit Proteinase K Reaktionslösung versetzt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie erneut mit der Reinigungslösung gereinigt und 10 min in H₂O gekocht um mögliche verbliebene Reste an Proteinase K zu inaktivieren. Die IPG-Streifenhalter wurden anschließend wieder 10 min in 1% SDS gekocht und erneut mit Proteinase K behandelt. Alle Materialien die mit Proteinase K in Berührung kamen, wurden gesondert aufbewahrt und nur für diesen Zweck benutzt.

Proteinase K Reaktionslösung in PBS	0,8 mg/ml Proteinase K
	0,5% SDS
	1 mM CaCl ₂

2.2.9 Proteintransfer (Western-Blot)

Beim Westernblot werden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer ortstreu auf eine polymere, makroporöse Membran übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert.

Der Proteintransfer wurde nach der „Semidry“ Methode durchgeführt. Hierzu wurden pro Gel vier Lagen Filterpapier und eine PVDF Membran auf Gelgröße zugeschnitten, die Membran kurz in Methanol aktiviert und wie die Filterpapiere in Blotpuffer eingeweicht. Der Blotaufbau bei Glycin/Tris Gelen (Blotpuffer 1) und NuPAGE Novex[®] 4-12% Bis/Tris Gelen (Blotpuffer 2) erfolgte luftblasenfrei ausgehend von der Anode in folgender Reihenfolge: zunächst zwei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und wiederum zwei

Lagen Filterpapier. Der Proteintransfer wurde bei konstanten 1 mA/cm^2 über 1 h durchgeführt.

Für den Western-Blot von Bicine/Bis-tris/Tris/Sulfat Gelen wurde das diskontinuierliche 3-Puffer-System benutzt (Wiltfang et al., 1997). Es wurde die „Semidry“ Methode wie oben beschrieben angewendet, jedoch mit drei verschiedenen Blotpuffern mit einem Aufbau wie in Abb. 4 schematisch dargestellt.

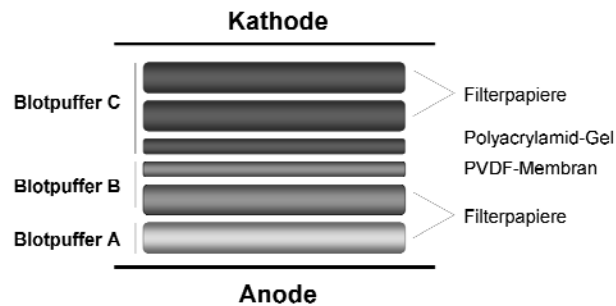


Abb. 4: Blotaufbau für den Proteintransfer von Bicine/Bis-tris/Tris/Sulfat Gelen.

Blot-Puffer 1	0,25 M Tris 0,192 M Glycin 20% (v/v) Methanol
Blot-Puffer 2	0,05 M Bicine 0,05 M Bis-Tris 0,01% (w/v) SDS 10% (v/v) Methanol
Blotpuffer A	0,21 M Tris 30% (v/v) Methanol
Blotpuffer B	0,025 M Tris 30% (v/v) Methanol
Blotpuffer C	0,025 M Tris 0,025% (w/v) SDS 5 mM Borsäure

2.2.10 Immundetektion

Bei der Immundetektion erkennt der eingesetzte Primärantikörper ein spezifisches Epitop des zu analysierenden Proteins bzw. Peptids. Der Sekundärantikörper ist gegen den von der Maus oder dem Kaninchen stammenden Primärantikörper gerichtet und an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Der Nachweis erfolgte hier durch Chemilumineszenz, nach Zugabe des Substrats Luminol, das in dem Nachweisreagenz enthalten ist.

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen 1 h bei RT in einer Blocklösung geschüttelt um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Die Primärantikörper wurden in Blockpuffer verdünnt (s. Tabelle 2) und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal je 10 min bei RT mit PBS-T gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen, und anschließend für 45 min mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Die Membranen wurden erneut dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und das Nachweisreagenz ECL plus™ zugegeben. Die Detektion erfolgte im Intas Imager mit Expositionszeiten zwischen 10 s und 10 min, in Abhängigkeit von der Signalintensität.

PBS-T

0,075% (v/v) Tween-20 in PBS

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper für die Immundetektion von Western-Blots.

	Antikörper	Verdünnung	Blockierlösung	Inkubation
Primär-AK	Maus-anti-A β 1E8	1:300 in Roti-Block	Roti-Block	über Nacht, 4°C
	Maus-anti-A β 6E10	1:1000 in 3% Milchpulver in PBS-T	3% Milchpulver in PBS-T	
	Ziege-anti-A β (N3pE)	1:100 in Roti-Block	Roti-Block	
Sekundär-AK	Ziege-anti-Maus-IgG POD	1:30 000 in PBS-T	-	45 min, RT
	Ziege-anti-Kaninchen IgG- POD	1:50 000 in PBS-T	-	
	Biotinyliertes Ziege-anti-Maus IgG	1:3000 in PBS-T	-	
	Biotinylierter Streptavidin-POD Komplex	1:3000 in PBS-T	-	

POD = Peroxidase; AK = Antikörper; RT = Raumtemperatur; IgG = Immunglobulin G

Um die Sensitivität bei der Analyse von A β -Peptiden zu verstärken, wurden die Membranen nach dem Proteintransfer 3 min in einer Mikrowelle aufgekocht um die Affinität des Antikörpers zu erhöhen (Ida et al., 1996). Zusätzlich konnte ein Verstärkungssystem benutzt werden, bei dem als Sekundärantikörper ein mit Biotin gekoppeltes Ziege-anti-Maus IgG diente. Dieses wurde nach dreimaligem waschen in PBS-T, durch einen Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex gebunden und nach wiederholtem Waschen erfolgte die Detektion wie oben beschrieben.

2.2.11 Coomassiefärbung

Zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden die Gele mit Coomassie Blau G250 gefärbt (Neuhoff et al., 1988). Diese Färbung ist kompatibel mit massenspektrometrischen Analysen und weist eine Nachweissensitivität von ca. 10 ng Protein auf. Das Gel wurde zuerst 1 h bei RT in Fixierlösung fixiert und je nach gewünschter Färbeintensität 4 bis 20 h bei RT in einem verschlossenen Gefäß unter leichtem Schütteln in Färbelösung 1 inkubiert. Anschließend wurde das Gel mehrmals in 20% Methanol gewaschen bis die Hintergrundfärbung entfernt wurde. Das Gel wurde auf einen Leuchtschirm aufgelegt, das Ergebnis mit einer Digitalkamera dokumentiert und das Gel anschließend in eine Folie in 20% Methanol eingeschweißt.

Um eine artifizielle Methylierung von Proteinen durch das in der Färbelösung enthaltene Methanol zu verhindern, wurde für Gele, die massenspektrometrischen Analysen dienten, die Färbelösung 2 verwendet. Es handelt sich hier um eine neue Modifikation der „Blue Silver“ Methode (Candiano et al., 2004) bei der Methanol durch Ethanol ersetzt wurde. Das Gel wurde bei dieser Färbung anschließend mit 20% Ethanol gewaschen.

Coomassie Färbelösung 1	0,08% (w/v) Coomassie Blau G250 8% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% (w/v) ortho-Phosphorsäure 20% (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung 2	0,12% (w/v) Coomassie Blau G250 10% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 10% (w/v) ortho-Phosphorsäure 20% (v/v) Ethanol

Fixierlösung	20% (v/v) Ethanol 2% (w/v) ortho-Phosphorsäure
--------------	---

2.2.12 Serva-Violett Färbung von IPG Streifen

Die in IPG-Streifen fokussierten Peptide wurden mit Serva Violet 17 gefärbt. Zunächst wurden die Peptide 20 min bei RT in einer Glutardialdehyd-Fixierlösung fixiert und 1 min in Entfärber gespült. Dann wurden die Peptide im Gelstreifen für 10 min mit SERVA Violet Färbelösung gefärbt und das Gel anschließend dreimal für 10 min bei RT mit Entfärber gewaschen. Nach weiteren zwei Waschschritten in H₂O konnte das Gel bei RT getrocknet werden und zur Dokumentation auf einem Leuchtschirm fotografiert werden.

Entfärber	3% (v/v) ortho-Phosphorsäure
Glutardialdehyd-Fixierlösung	0,5% (v/v) Glutardialdehyd 50 mM Natriumacetat 2 mM Natriumthiosulfat 30% (v/v) Ethanol
SERVA Violet Färbelösung	0,1% (w/v) SERVA Violet 17 10% (v/v) ortho-Phosphorsäure

2.2.13 Quantifizierung von Peptidbanden im Western-Blot

Die Peptidbanden auf den Western-Blots wurden mit der Quantity One[®] 4.6.5 Software quantifiziert. Auf den digitalen Blotabbildungen wurden die jeweiligen Banden als Rechtecke markiert und Rechtecke entsprechender Größe für die Hintergrundkorrektur auf Bereiche der Blots ohne Proteinbanden platziert. Die Signalintensität und Größe der Flächen wurde durch die Software berechnet und der Hintergrund von den jeweiligen Werten abgezogen. Es wurde die 'Global Background Subtraction Method' für den Hintergrundabzug gewählt. Für die Quantifizierung wurden sechs Standards, die zwischen 120 pg bis 1 pg des synthetischen Aß(1-40) Peptides enthielten, auf die Gele aufgetragen. Die Software berechnet aus den Signalen für die Standards eine Regressionskurve, anhand derer die Peptidmenge der Proben berechnet werden kann. Von den Proben wurden jeweils Doppelbestimmungen auf zwei verschiedenen Blots durchgeführt, der Mittelwert (MW) ermittelt und für weiterfolgende

Berechnungen verwendet. Die Proben mussten in einigen Fällen verdünnt werden, so dass die Konzentrationen möglichst im linearen Bereich der Kurve lagen.

2.2.14 Electrochemiluminescence (ECL) Technologie

Für die Quantifizierung von A β -Peptiden und sAPP α / β aus Zellkulturüberständen wurde die ECL-Technologie von Meso Scale Discovery (MSD[®]) verwendet. Hierzu wurden Karbonplatten mit 96 Vertiefungen benutzt, in die am Boden der Platte Elektroden integriert sind. Der Boden der Vertiefungen ist mit Antikörpern beschichtet, die gegen das Zielprotein gerichtet sind („Capture“ Antikörper). Der Detektions-Antikörper, der ein anderes Epitop des Zielproteins erkennt, ist mit einem Ruthenium-Komplex gekoppelt. Nach elektrischer Anregung, die im Boden der Platte initiiert wird, emittiert der Ruthenium-Komplex Licht, das als Detektionssignal dient. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Konzentrationsreihen von synthetischen Standards hergestellt, die die vom Hersteller mitgelieferte Software zur Berechnung einer Regressionskurve benutzt. Bei Multi-Spot Platten ist in jeder Vertiefung der Platte ein definiertes Muster verschiedener „Capture“ Antikörper aufgebracht. Dies ermöglicht die simultane Messung mehrere Isoformen eines Analyten, die mit dem gleichen Detektions-Antikörper analysiert werden, z.B. verschiedene C-terminale A β -Peptidvarianten.

A β -Peptide in Zellkulturüberständen wurden mit dem MSD[®] Human (6E10) Abeta 40 Kit oder dem MSD[®] Human (6E10) Abeta 3-Plex 38/40/42 Kit (für die simultane Messung von A β 38, A β 40 und A β 42) nach Angaben des Herstellers auf einem Sector[®] Imager 6000 gemessen. Für die Messungen der Telencephalonkulturen des Huhns wurden die synthetischen Standards in dem Kultivationsmedium verdünnt. Das Zellkulturmedium der SH-SY5Y Zellen enthält fötales Kälberserum, das A β -Peptide enthält, die die gleiche Aminosäuresequenz wie das humane A β besitzen. Die Standards wurden deshalb in diesem Fall in 1% Blocker A verdünnt und eine Mediumkontrolle mitgemessen. Diese Kontrollmessungen ergaben, dass das SH-SY5Y-Medium ca. 50 pg/ml A β 40 enthielt. Dieser Hintergrundwert wurde von den berechneten Konzentrationen in den gemessenen Proben abgezogen. Auf jeder Platte wurde ein Aliquot eines bei -20°C gelagerten Überstandes einer Hühnertelencephalonkultur mitgemessen, um mögliche Unterschiede in den Chargen der Kits zu erkennen. Lösliches APP α und APP β wurde in Zellkulturüberständen simultan mit dem MSD[®] sAPP α /sAPP β Multiplex Assay nach Angaben des Herstellers gemessen. Die synthetischen Standards wurden im jeweiligen Zellkulturmedium hergestellt. Den Standards sowie den Proben wurde 50 mM HEPES zugesetzt.

2.3 Massenspektrometrie

Die in dieser Arbeit vorgestellten massenspektrometrischen Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Hartmut Kratzin und Dr. Olaf Jahn am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt.

2.3.1 Extraktion der Peptide aus 2D-Gelen

Die zu analysierenden Spots aus den Coomassie-gefärbten 2D-Gelen wurden mit einem Skalpell herausgeschnitten und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Gelstücke wurden mit einem Glasstab in 50 µl Extraktionslösung zerkleinert und der Glasstab mit weiteren 50 µl Extraktionslösung gespült, die ebenfalls zu den zerkleinerten Gelstücken gegeben wurden. Für die Extraktion der Peptide wurde die Probe 1 h bei 37°C geschüttelt, danach 10 min im Ultraschallbad inkubiert und anschließend 10 min bei RT und 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit dem Sediment wurde die Extraktion zunächst mit weiteren 100 µl Extraktionslösung, zuletzt mit 100 µl Acetonitril wiederholt und die Überstände zusammengeführt. Für die Massenbestimmung (s. 2.3.2) wurden 30 µl eingesetzt, die im Vakuumkonzentrator auf ca. 0,5 µl eingengt und mit je 1,5 µl Acetonitril und 1,5 µl 0,1% Trifluoracetat versetzt wurden.

Extraktionslösung

4% (v/v) Ammoniak

33% (v/v) Isopropanol

2.3.2 Massenbestimmung durch Matrix-unterstützte Laserdesorptions Ionisations (MALDI) – Flugzeit-Massenspektrometrie

Bei der MALDI werden Proteine oder Peptide auf einem Probenhalter mit UV-absorbierenden Molekülen („Matrix“) ko-kristallisiert. Ein Laserbeschuss löst eine Desorption der Proteine in die Gasphase aus. Die Matrixmoleküle übertragen Protonen auf die Proteine und laden sie damit positiv auf. Diese Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt bevor sie in einen Flugzeitanalysator (TOF) eingespeist werden. In dem Flugrohr herrscht ein feldfreies Hochvakuum, so dass die Ionen nicht mehr beschleunigt werden. Am Ende des Flugrohrs treffen die Ionen auf einen Detektor. Anhand der Länge des Flugrohrs, der Beschleunigungsspannung und der gemessenen Flugzeit kann das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) berechnet werden.

Es wurde eine Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure hergestellt. Der Probenauftrag erfolgte nach der „Dried Droplet“ Methode auf „AnchorChip“ Probenhalter (Bruker Daltonic, Bremen). Es wurden zuerst 0,5 µl der Matrix auf den Probenhalter pipettiert, dann 0,5 µl der Probe zugegeben, in der Spitze der Pipette gemischt und das Gemisch auf dem Probenhalter getrocknet. Die Messung wurde mit einem Ultraflex MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Bremen) im linearen Modus durchgeführt.

Matrix	130 mM 2,5-Dihydroxybenzoesäure
	50% (v/v) Acetonitril
	0,05% (v/v) Trifluoressigsäure

2.3.3 Lys-C Verdau von Aβ-Peptiden

Die Endoprotease Lys-C spaltet an der C-terminalen Seite von Lysinresten. Der Verdau der Peptide mit Lys-C wurde im Gel durchgeführt. Hierzu wurden die Gelstücke zunächst 5 min mit 25 mM Ammoniumbicarbonat, anschließend 15 min mit Acetonitril gewaschen und zuletzt 15 min bei 37°C getrocknet. Die Protease Lys-C wurde nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) präpariert und der Verdau mit 6 µl Lys-C und 6 µl Verdau-Puffer über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde am nächsten Tag durch die Zugabe von 15 µl 0,5% (v/v) Trifluoressigsäure / 10% (v/v) Acetonitril abgestoppt.

2.3.4 Peptid Sequenzierung durch Tandem Massenspektrometrie (MS/MS)

Ausgangsmaterial für die MS/MS waren die Peptide nach Lys-C Verdau. Bei der MS/MS wird im ersten Massenspektrometer ein Peptid ausgewählt, dass in einer Kollisionskammer fragmentiert wird. Die Fragmente werden in dem zweiten Massenspektrometer analysiert. Bei der Kollision kann eine Peptidkette an drei Stellen brechen wie in Abb. 5 dargestellt. Meistens brechen die Peptide an der schwächsten Stelle, der Säureamidbindung. Es entstehen dadurch N-terminal die sogenannten b-Ionen und C-Terminal die sogenannten y-Ionen (Abb. 5). Anhand der Massen dieser Ionen kann eine Sequenzierung durchgeführt werden und bei bekannter Sequenz die Position einer Modifikation bestimmt werden.

Für die Massenbestimmung und die Fragmentierung wurde der Ultraflex MALDI-TOF Massenspektrometer im Reflektron Modus benutzt.

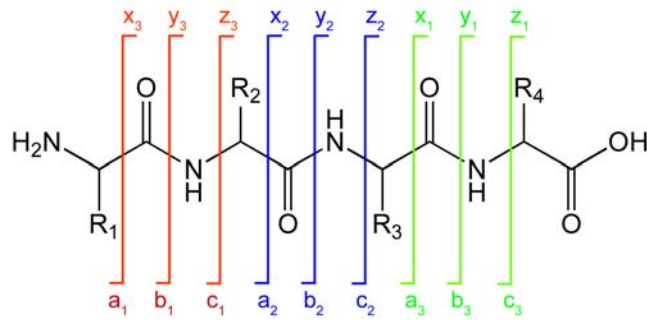


Abb. 5: Fragmentierung eines Peptides nach Kollision.

Je nach Bruchstelle, können N-terminal a-, b- und c-Ionen entstehen. C-terminal entstehen die x-, y- und z-Ionen.

2.4 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen, bzw. semisterilen für die Präparation der Primärzellen, in einer Zellkulturwerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.4.1 Kultivierung von SH-SY5Y Zelllinien

Bei den SH-SY5Y Zellen handelt es sich um eine humane Neuroblastomzelllinie. SH-SY5Y APPwt Zellen überexprimieren stabil APP₆₉₅ (Wild-Typ APP), die SH-SY5Y APPsw Zellen APP₆₉₅ mit der schwedischen Mutation (K670N/M671L) (Münter et al., 2010). Beide APP-Konstrukte enthalten einen N-terminalen Myc-Tag und einen C-terminalen Flag-Tag. Die Genexpression erfolgte über den episomalen Vektor PCEP4, als Selektionsmarker wurde dem SH-SY5Y-Kultivationsmedium Hygromycin B zugegeben.

SH-SY5Y-Kultivationsmedium

D-MEM/F12

10% fötales Kälberserum

2 mM L-Glutamine

Non Essential Amino Acids

50 µg/ml Hygromycin B

2.4.2 Primäre Hühnertelencephalonkulturen

Die Präparation und Kultivierung von primären neuronalen Hühnertelencephalonkulturen (CTN) wurde nach Pettmann et al. (1979) am Embryonaltag E8 unter einem Stereomikroskop, das unter die Sterilbank geschwenkt wurde, durchgeführt. Je nach geplantem Versuch wurden 5 bis 15 Eier präpariert, die Ausbeute lag im Schnitt bei ca. 6,5 Millionen Zellen pro Embryo.

Einen Tag vor der Präparation wurden die Zellkulturplatten mit einer Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet. Das positiv geladene Poly-L-Lysin haftet an der Plastikoberfläche und ermöglicht die Adhärenz der Neuronen. Mit einer gebogenen Pinzette wurde das Ei an dem Ende, an dem sich die Luftblase befindet, aufgebrochen, die Eimembran vorsichtig entfernt, der Embryo herausgezogen und in eine sterile Schale gelegt. Der Embryo wurde dekapitiert und der Kopf unter das Stereomikroskop gelegt. Das Telencephalon wurde herauspräpariert, die Meningen entfernt und das Gewebe zunächst in eiskaltem D-MEM/HEPES gesammelt. Anschließend wurde das Gewebe 12 min bei 37°C in Trypsin/EDTA (0,5%/0,2%) inkubiert. Trypsin spaltet extrazelluläre Matrixmoleküle, so dass die Zellen aus ihrem Verband gelöst werden. EDTA ist ein Chelatbildner, der zweiwertige Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , die für die Zellanhaftung benötigt werden, bindet. Nach dem Verdau wurden die Zellen zweimal mit D-MEM gewaschen und in 10 ml D-MEM/HEPES aufgenommen. Um eine homogene Zellsuspension zu erhalten wurden die Zellen dreimal mit einer 10 ml Spritze langsam auf- und abgezogen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 500 g wurden die Zellen in 10 ml Anheftungsmedium resuspendiert. Um verbliebene Zellagglomerate zu entfernen wurde die Zellsuspension auf ein Sieb mit einer Porengröße von 73 μm gegeben. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer ermittelt und die Zellen in einer Dichte von 375 000 Zellen/ cm^2 in Anheftungsmedium ausgesät. Nach einer Anheftungszeit von 30 min wurde das Anheftungsmedium durch Kultivationsmedium ersetzt. Am dritten Tag *in vitro* wurde ein 50%iger Medienwechsel, am vierten Tag *in vitro* ein 100%iger Medienwechsel durchgeführt.

Poly-L-Lysin Lösung	0,1 mg/ml Poly-L-Lysin 0,1 M Borat/NaOH-Puffer, pH 8,4
D-MEM/HEPES	10 mM HEPES in D-MEM
Anheftungsmedium	D-MEM 5% (v/v) fötales Kälberserum 5% (v/v) Hühnerserum
Kultivationsmedium	Neurobasal-A-Medium B27-Supplemente 2 mM Glutamin

2.4.3 Zellviabilitätsassays

Um auszuschließen, dass die Wirkungen von Testsubstanzen auf toxische Effekte zurückzuführen sind, wurde die Zellviabilität nach Inkubation mit den Substanzen mit zwei kolorimetrischen Test überprüft. Hierfür wurden Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Die äußeren Ränder wurden nur mit Medium befüllt, um Randeffekte auf die Zellen zu minimieren. Es wurden acht Konzentrationen und zwei Kontrollen (das Lösungsmittel und Medium) auf einer Platte getestet. Jeweils sechs Vertiefungen einer Reihe wurden mit dem gleichen Ansatz behandelt, die Mittelwerte der Messwerte gebildet und diese relativ zu der Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt.

2.4.3.1 MTT-Test

Der MTT-Test spiegelt die metabolische Aktivität der Zellen wider. Er beruht auf der Umsetzung des gelben Tetrazoliumsalzes zu einem blauen Formazanfarbstoff. Diese NADPH abhängige Reduktion wird nur in vitalen Zellen durch die mitochondriale Dehydrogenase katalysiert (Mosmann, 1983). Pro Vertiefung wurden 50 µl des Überstandes abgenommen und mit 50 µl einer MTT-Lösung (40% w/v in Medium) ersetzt. Nach 45 min Inkubation bei 37°C wurde die Inkubationslösung abgesaugt und das Formazanprodukt durch Zugabe von 100 µl DMSO pro Vertiefung in Lösung gebracht. Die Absorption wurde mit dem Infinite[®] 200 Reader bei einer Messwellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 665 nm bestimmt.

2.4.3.2 Lactat-Dehydrogenase-Test

Der CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay von Promega misst quantitativ die Lactatdehydrogenase (LDH) Aktivität in Zellkulturüberständen. Die LDH ist ein cytosolisches Enzym, das bei intakten Zellen kaum im Überstand zu finden ist. Der Test spiegelt also die Membranintegrität der Zellen wider. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Ausgangsmaterial waren die Überstände, die zuvor beim MTT-Test von den Zellen abgenommen wurden. Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen.

2.4.4 Behandlung von Zellen mit potentiellen β -Secretase Inhibitoren

Von den Testsubstanzen wurden Stammkonzentrationen von 10 mM in sterilem DMSO hergestellt und in Aliquots bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurden 100fache Konzentrationen der Testkonzentration in DMSO hergestellt und in Zellkulturmedium 1:100 verdünnt. Die DMSO-Endkonzentration betrug somit bei jedem Ansatz 1%. Eine Behandlung mit 1% DMSO wurde in jedem Versuch als Kontrolle mitgeführt („Vehikelkontrolle“).

Bei den CTN wurden die Versuche am fünften Tag *in vitro* in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen durchgeführt. Vier Vertiefungen einer Platte wurden für einen Ansatz benutzt und die Inkubationszeiten für die Substanzen betrugen 20 h. SH-SY5Y-Zellen wurden am Vortag des Versuchstages in einer Zelldichte von 150 000 Zellen/cm² ausgesät. Für die ECL-Messungen wurden Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen benutzt, bei denen die äußeren Ränder nur mit Medium befüllt wurden und sechs Vertiefungen für einen Ansatz dienten. Die Inkubationszeit betrug 4 h. Sollten Western Blots durchgeführt werden, wurden die Zellen auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und die Inkubationszeit auf 24 h verlängert.

2.4.5 Zellernte und -lyse

Die Zellernte und -lyse wurde auf Eis durchgeführt. Das konditionierte Medium wurde abgenommen, gleiche Ansätze zusammengeführt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Um die Zellen vom Boden der Kulturschale abzulösen wurde das Medium mit 2 mM EDTA in PBS ersetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgelöst und die Zellsuspension wurde 5 min bei 500 g und RT zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 2 mM EDTA in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und sofort lysiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 100 μ l eiskaltem Triton-X100 Lysepuffer (bei einem Zellpool aus Zellen von vier von 24 Vertiefungen einer Zellkulturplatte). Der Puffer enthält das nicht-ionische Detergenz Triton X-100, das Membranen auflöst. Ein Protease Inhibitor Cocktail verhinderte die Proteolyse, ein Phosphatase Inhibitor Cocktail schützte vor Dephosphorylierung der Proteine. Die Lysate wurden 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 4°C und 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wie das Pellet bei -20°C gelagert.

Triton X-100 Lysepuffer	30 mM Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1% (w/v) Triton X-100
	1 mM EDTA
	2 mM DTT
	10% (w/v) Glycerol
	Complete [®] Protease Inhibitor Cocktail
	Phosphatase Inhibitor Cocktail

2.4.6 Dosis-Wirkungskurven und EC₅₀ Bestimmungen für Testsubstanzen

Für die Berechnung von Dosis-Wirkungskurven und der mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) in SH-SY5Y Zellen, wurden die Zellen mit ausgewählten Testsubstanzen in halb-logarithmischen Konzentrationsreihen behandelt und die Aβ₄₀ Konzentrationen im Überstand bestimmt. Es wurden neun Konzentrationen in einem Versuch in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen bei einer Inkubationszeit von 4 h getestet. Je sechs Vertiefungen wurden für einen Ansatz verwendet und gleiche Ansätze wurden anschließend zusammengeführt. Die Aβ₄₀ ECL-Messungen fanden in Duplikaten statt, und die berechneten Konzentrationen wurden auf die Vehikelkontrolle (1% DMSO) normalisiert. Die normalisierten Werte von drei unabhängigen Experimenten wurden „gepoolt“ um daraus die Dosis-Wirkungskurven mit der GraphPad Prism 5.01 Software zu berechnen. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der EC₅₀-Werte der Kurven wurde durch den Extra sum-of-squares F test getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Analysen der Amyloidpathologie in APP23 Mäusen

Für eine biochemische Analyse der Amyloidpathologie von APP23 Mäusen wurden die Gehirnhälften von 3, 7, 15 und 24 Monate alten Mäusen einer seriellen Proteinextraktion unterzogen. Zunächst wurden die detergenzlöslichen Proteine durch einen Puffer, der drei verschiedene Detergenzien enthielt, aus dem Gewebe extrahiert (Detergenz-Fraktion). Das verbleibende unlösliche Material wurde anschließend mit 70% Ameisensäure behandelt um die aggregierten und schwerlöslichen Plaquebestandteile in Lösung zu bringen (Ameisensäure-Fraktion). Die A β -Peptide in den Proben wurden durch Harnstoff SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper 1E8 nachgewiesen. Dieser Antikörper erkennt nach SDS-Hitzedenaturierung im Western-Blot die ersten beiden Aminosäuren des humanen A β -Peptides und somit alle C-terminalen Varianten (Wiltfang et al., 2001).

3.1.1 Semi-quantitative Bestimmung von A β -Peptiden anhand von Western-Blots

Die Konzentrationen der verschiedenen A β -Peptide wurden durch semi-quantitative Analysen der Western-Blots bestimmt. Hierzu wurde auf den Gelen neben den Proben jeweils eine Verdünnungsreihe von synthetischen A β -Peptiden aufgetragen. Mit Hilfe der QuantityOne Software wurde aus den bekannten Konzentrationen der synthetischen A β (1-40) Peptide und deren Signalstärken eine Regressionskurve erstellt, aus deren Formel die Konzentrationen der Proben berechnet wurden. Ein Beispiel für eine solche semi-quantitative Bestimmung der A β -Peptide A β (1-40) und A β (1-42) ist in Abb. 6 gezeigt. Da die Proben stark unterschiedliche Mengen an A β -Peptiden enthielten, wurden sie anhand von Vorversuchen so verdünnt, dass sie im quantifizierbaren Bereich der Regressionskurve lagen und die zu quantifizierenden Mengen durch die Standards abgedeckt wurden. Nach Auswertung von 20 Western-Blots ergab sich für diese Methode ein unteres Detektionslimit von $3,1 \text{ pg} \pm 2,7$ (Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD)). Definiert wurde diese untere Nachweisgrenze als Peptidmenge, die ein Signal erzeugte, das dem MW des Hintergrundsignals plus $2,5 \text{ SD}$ entsprach. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen auf zwei separaten Blots durchgeführt und jeweils der MW bestimmt. Die Variationskoeffizienten für die Abweichungen der so berechneten Konzentrationen zwischen den Duplikaten betrug $13\% \pm 11\%$ (MW \pm SD; n = 68).

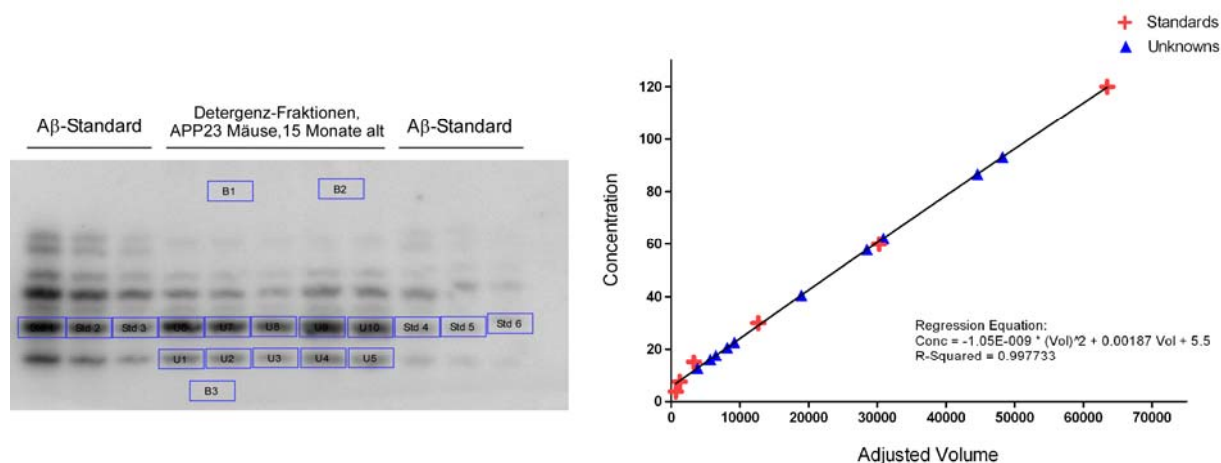


Abb. 6: Quantifizierung von Aβ-Peptiden auf Blot-Membranen mit der QuantityOne Software.

Links ist eine repräsentative Blotmembran und die Quantifizierung von Aβ(1-42) und Aβ(1-40) gezeigt (Detergenz-Fractionen von 15 Monate alten APP23 Mäusen). Die zu quantifizierenden Banden wurden durch Rechtecke markiert. S1 - S6: synthetische Standards, die Aβ(1-40) Mengen zwischen 120 pg und 3,75 pg enthielten. U1 - U10: Proben mit unbekannter Konzentration. B1 - B3: Hintergrundsignal. Rechts ist die zum Blot zugehörige Regressionskurve gezeigt.

3.1.2 Altersabhängige Akkumulation von Aβ-Peptiden in APP23 Mäusen

Da beim Menschen der Hauptrisikofaktor für eine AD das Altern ist, wurde die altersabhängige Entwicklung der Aβ-Akkumulation in den APP23 Mäusen betrachtet. Detergenz-lösliche Aβ-Peptide konnten in allen Altersgruppen nachgewiesen werden. Die schwer löslichen Peptide in der Ameisensäure-Fraktion, die kennzeichnend für amyloide Plaques sind, waren jedoch erst ab einem Alter von 7 Monaten detektierbar. In beiden Fraktionen stieg die Gesamtmenge an Aβ-Peptiden mit dem Alter drastisch an (Tabelle 3).

Tabelle 3: Aβ-Gesamtmenen im Gehirngewebe von APP23 Mäusen.

Alter		3 Monate (n=4)	7 Monate (n=5)	15 Monate (n=5)	24 Monate (n=8)
Aβ-Gesamtmenge (ng/mg Feuchtwicht) [#]	Detergenz-Fraktion	0,42 ± 0,03	0,63 ± 0,06	43,32 ± 13,82	490,16 ± 169,77
	Ameisensäure-Fraktion	—	0,07 ± 0,04	56,68 ± 20,51	316,43 ± 56,73

[#] Aβ-Peptide von 3, 7, 15 und 24 Monate alten Mäusen wurden nach Harnstoff SDS-PAGE/Western-Blot mit dem Antikörper 1E8 angefärbt und quantifiziert. Die angegebenen Aβ-Gesamtmenen sind die Summen von Aβ(1-42), -(1-40), (1-39), -(1-38) und -(1-37). Für jede Gruppe ist der Mittelwert (MW ± SD) und die Anzahl der Tiere (n) angegeben.

Unabhängig vom Alter war Aβ(1-40) in allen Fraktionen das hauptsächliche Aβ-Peptid, wie in Abb. 7A, die repräsentative Blots von Proben aus allen Altersgruppen zeigt, zu sehen ist. Der relative Anteil an Aβ(1-42), hier dargestellt als das Verhältnis Aβ(1-42)/(1-40), änderte sich in Abhängigkeit vom Alter der Tiere. In der Detergenz-Fraktion blieb dieses

Verhältnis zwischen 3 und 15 Monaten alten Tieren zunächst stabil bei ca. 0,3, sank jedoch in den 24 Monate alten Mäusen statistisch signifikant auf 0,16. Eine einfaktorielle Varianzanalyse (1 way ANOVA) gefolgt von multiplen Tukey-Kramer Vergleichstests (Tukey's post test) ergab p-Werte kleiner als 0,001 für die Vergleiche zwischen den 24 Monate alten Mäusen zu den jüngeren Altersgruppen (Abb. 7B).

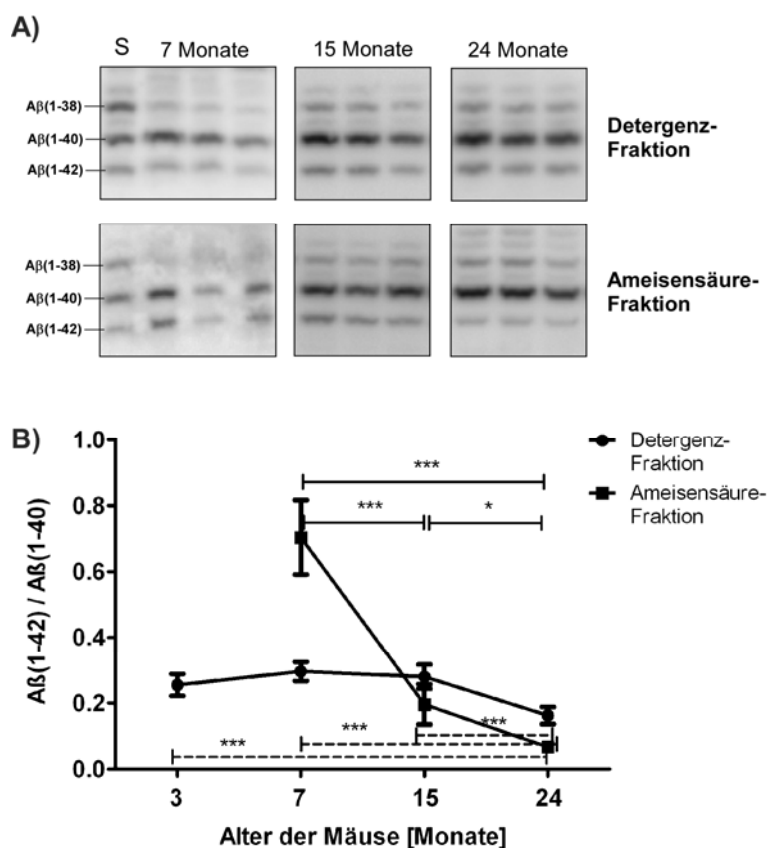


Abb. 7: Altersabhängige relative Verteilung von Aβ(1-42) und Aβ(1-40) in Gehirnpunkten von APP23 Mäusen.

Aβ-Peptide wurden durch Harnstoff SDS-PAGE/Western-Blot mit dem Antikörper 1E8 analysiert und anschließend quantifiziert. A) Repräsentative Blots der Detergenz- und Ameisensäure-Fractionen aus den Gehirnpunkten von 7, 15 und 24 Monate alten APP23 Mäusen. Von jeder Detergenz-Fraktion wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Es wurden 10 µg (7 Monate), 0,5 µg (15 Monate) bzw. 0,1 µg (24 Monate) Gesamtprotein aufgetragen. Aus den Ameisensäure-Fractionen wurden von folgenden Verdünnungen je 5 µl aufgetragen: 1:5 (7 Monate), 1:1000 (15 Monate) und 1:10 000 (24 Monate). B) Relative Aβ(1-42)/(1-40) Verhältnisse in den Detergenz- und Ameisensäure-Fractionen der angegebenen Altersgruppen (MW ± SD). S = synthetische Aβ-Peptide. *: p < 0,05; ***: p < 0,001.

In der Ameisensäure-Fraktion der 7 Monate alten Mäuse, die ein frühes Stadium der Plaque-Pathologie markiert, hatte Aβ(1-42) einen relativ hohen Anteil an der Gesamtmenge, der sich altersabhängig verringerte. So betrug das Aβ(1-42)/(1-40) Verhältnis in 7 Monate alten Mäusen 0,7, in 24 Monate alten Mäusen jedoch nur noch 0,07 (p < 0,001 für den Vergleich

der Altersgruppen 7 versus 15 Monate und 7 versus 24 Monate; $p < 0,05$ für den Vergleich der Altersgruppen 15 versus 24 Monate; 1 way ANOVA mit Tukey's post test; Abb. 7B).

3.1.3. Vergleich der A β -Peptidmuster in Amyloidablagerungen zwischen Mensch und Maus

Um die A β -Peptidmuster in Gehirnen von APP23 Mäusen mit der humanen AD Pathologie zu vergleichen wurden fünf post mortem gewonnene humane Gewebeproben von der Netherlands Brain Bank bezogen. Das Gewebe war dort von Spendern entnommen worden, die ihr schriftliches Einverständnis für eine Gehirnautopsie gegeben hatten. Dieses Einverständnis schloss die Nutzung des Materials für klinische Informationen und Forschungsvorhaben ein. Das Gewebe stammte aus den Temporallappen von drei AD-Patienten (Braak-Stadium 5 und 6) und von zwei nicht dementen Kontrollen (beide Braak-Stadium 1). Der Zeitpunkt der Gewebeentnahme nach dem Tod lag zwischen 3 h 30 min und 5 h 35 min. Das Alter der Patienten zu dem Zeitpunkt ihres Todes betrug $80 \pm 4,8$ Jahre (MW \pm SD). Diese Angaben wurden den von der Netherlands Brain Bank zur Verfügung gestellten Unterlagen entnommen.

3.1.3.1 C-terminale A β -Peptidvarianten

Western-Immunoblotanalysen der Detergenz- und Ameisensäure-Fraktionen nach 1D-Auftrennungen zeigten grundlegende Unterschiede in den A β -Peptid Mustern zwischen den humanen Proben und denen aus 24 Monate alten APP23 Mäusen. Bei den APP23 Mäusen waren die detektierten A β -Peptidmuster in den Detergenz- und Ameisensäure-Fraktionen augenscheinlich relativ ähnlich und es waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen zu erkennen. Neben großen Mengen an A β (1-40) wurden zusätzliche Peptide nachgewiesen, die mit synthetischem A β (1-42), -(1-39), -(1-38) und (1-37) komigrierten (Abb. 8) (für die eindeutige Identifizierung siehe Kapitel 3.1.5).

In allen drei untersuchten Proben von AD-Patienten und einer der beiden nicht dementen Kontrollproben wurden A β -Peptide in beiden Fraktionen nachgewiesen. In der zweiten nicht dementen Kontrolle waren unter diesen Bedingungen keine A β -Peptide detektierbar. Die A β -Peptidmuster in den Detergenz- und Ameisensäure-Fraktionen unterschieden sich deutlich voneinander. Die vier A β -positiven Detergenz-Fraktionen enthielten als Hauptkomponente ein mit synthetischem A β (1-42) komigrierendes A β -Peptid, sowie eine etwas schneller laufende Variante auf Höhe von A β (2-42). In den Ameisensäure-

Fraktionen hingegen war ein individuelles Muster in jeder Probe zu sehen: In unterschiedlichen relativen Verteilungen wurden in allen vier A β -positiven Ameisensäure-Fraktionen A β -Peptide beobachtet, die mit A β (1-42), A β (1-40) und A β (2-42) komigrierten. In einigen Proben war zusätzlich eine Bande in Höhe von A β (1-38) zu sehen (Abb. 8).

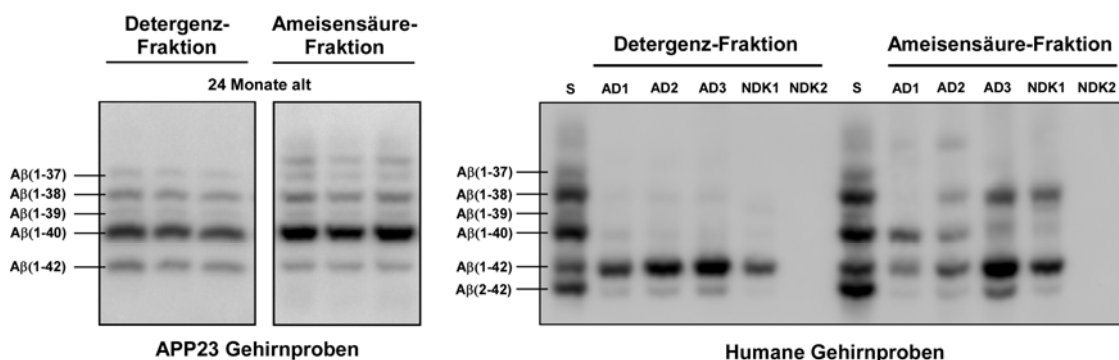


Abb. 8: Unterschiede in den C-terminalen A β -Peptidvarianten zwischen Maus und Mensch.

A β -Peptide aus Detergenz- und Ameisensäure-Fractionen von humanen Proben und APP23 Mausproben wurden durch Harnstoff SDS-PAGE/Western-Blots analysiert. Es wurden folgende Mengen aufgetragen: Für die APP23 Proben je 0,5 μ g Gesamtprotein (Detergenz-Fraktion) bzw. 5 μ l einer 1:10 000 Verdünnung (Ameisensäure-Fraktion). Für die humanen Proben je 0,5 μ g Gesamtprotein (Detergenz-Fraktion) bzw. 5 μ l einer 1:1000 Verdünnung (Ameisensäure-Fraktion). S: Synthetische A β -Peptid Standards; AD = Probe von einem Patienten mit Alzheimer Demenz. NDK: Nicht demente Kontrollprobe.

3.1.3.2 N-terminale Variationen des A β -Peptides

Um die beobachteten Varianten des A β -Peptides näher zu charakterisieren und zu untersuchen ob Trunkierungen des N-Terminus oder andere Modifikationen, die den isoelektrischen Punkt beeinflussen können, vorlagen, wurden sie mittels 2DE analysiert. In Abb. 9A ist eine 2DE mit anschließendem 1E8 Western-Immunoblot von synthetischen A β -Peptiden zu sehen. Die Peptide die am Aspartat an Position 1 begannen, wiesen alle einen pI von ca. 5,4 auf. Da die letzten fünf Aminosäuren des A β -Peptides ungeladen sind, zeigen alle untersuchten C-terminalen Varianten den gleichen pI. Durch die Abspaltung des negativ geladenen Aspartats an Position 1 wird der pI von A β (2-40) und A β (2-42) basischer und verschiebt sich auf einen pH-Wert von etwa 6,2. Diese experimentell bestimmten Werte sind in guter Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten pI Werten von 5,59 für A β (1-x) und 6,25 für A β (2-x) (Protein Calculator 3.3; www.scripps.edu/~cdputman/protcalc.html). Korrespondierende Spots mit einem pI vom etwa 6,2 wurden sowohl in den humanen Proben als auch in denen aus den APP23 Mäusen mit dieser Methode nachgewiesen.

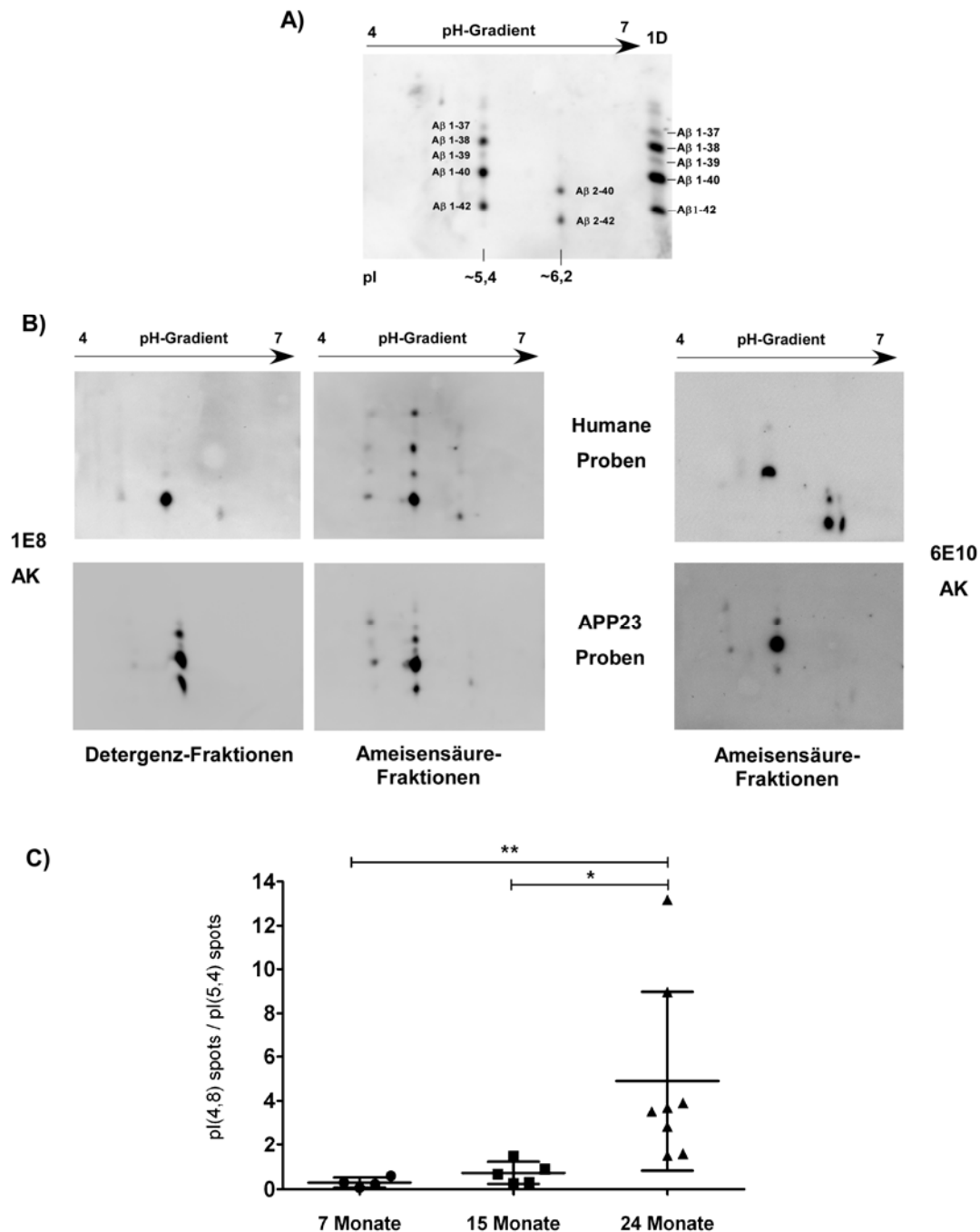


Abb. 9: 2D-Auftrennungen von synthetischen Aβ-Peptiden, humanen AD-Proben und APP23 Maus Proben.

Aβ-Peptide wurden isoelektrisch nach ihrer Ladung fokussiert (linearer pH-Gradient 4-7), anschließend durch Harnstoff SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit dem 1E8- oder 6E10-Antikörper angefärbt. A) 2D Blot von synthetischen Peptiden: Aβ(1-37), -(1-38), -(1-39), -(1-40), -(1-42), -(2-40) und -(2-42). B) Repräsentative Blots nach 2DE von der Detergenz- und der Ameisensäure-Fraktion der humanen Probe AD3 (s. auch Abb. 8) und einer 24 Monate alten APP23 Mausprobe. Für die Immundetektion wurden die Antikörper 1E8 oder 6E10 eingesetzt. AK = Antikörper C) Die Signalintensitäten der Spots auf 2D Blots in den Ameisensäure-Fractionen von 7, 15 und 24 Monate alten APP23 Mäusen wurden mit der QuantityOne Software bestimmt und auf die Signalintensität der Peptide in einem 1D-Standard auf dem Blot geeicht. Daraus wurden die Verhältnisse der Summe der pI 4,7 Spots zu der Summe der pI 5,4 Spots berechnet. Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post test ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen 7 und 24 Monate bzw. 15 und 24 Monate alten Tieren. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

In den humanen Proben war bei einem pI von ca. 6,2 vor allem, wie in den 1D Blots schon angedeutet, das A β (2-42) Peptid zu sehen. In den APP23 Proben war A β (2-40) regelmäßig in den Ameisensäure-Fractionen aller Altersgruppen nachweisbar (Abb. 9B). Der Antikörper 6E10 erkennt im Vergleich zu dem Antikörper 1E8 weitere N-terminale A β -Peptidvarianten (Vanderstichele et al., 2005). Wurden 2D Blots von APP23 Proben mit 6E10 gefärbt war das A β -Peptidmuster vergleichbar zu der 1E8 Färbung. Hingegen waren bei den 2D Blots von humanen Proben nach 6E10 Färbung im unteren Bereich der Blots weitere Spots mit pI-Werten im Bereich von ca. 6,2 und mit deutlichen Signalen erkennbar (Abb. 9B).

Zusätzlich wurde sowohl in den humanen Proben als auch bei den APP23 Mäusen eine Reihe von Spots mit einem saureren pI von ca. 4,7 detektiert (Abb. 9B). Diese traten in Detergenz- und Ameisensäure-Fractionen auf, schienen jedoch in den Ameisensäure-Fractionen in größeren Mengen vorhanden zu sein. Ein Vergleich der Signalintensitäten auf den 2D-Blots von Proben von Ameisensäure-Fractionen von APP23 Mäusen, deutete eine Zunahme des relativen Anteils dieser Peptide mit zunehmendem Alter an (Abb. 9C).

Das N-terminal verkürzte A β (N3pE), das an Position 3 mit einem Pyroglutamat beginnt, ist die in humanen Plaques am häufigsten gefundene Modifikation am A β -Peptid (Kuo et al., 1997; Saido et al., 1995). Mit einem spezifischen Antikörper, der gegen dieses Epitop gerichtet ist, konnte dies in den hier verwendeten humanen Proben bestätigt werden (Abb. 10A). Es wurde hauptsächlich die 42 Aminosäuren lange Variante des A β (N3pE)s nachgewiesen. Der Blot wurde mit dem Antikörper 6E10 nachgefärbt, der verschiedene N-terminale Varianten des A β -Peptides, inklusive der A β (N3pE) Peptide erkennt. Anhand der Bandenintensitäten der Blots wurde der relative Anteil des A β (N3pE)-Peptides in den untersuchten humanen Detergenz-Fractionen auf 25% - 58% und in den Ameisensäure-Fractionen auf 18% - 35% der A β -Gesamtmenge geschätzt. In den APP23 Mäusen konnten nur in den Ameisensäure-Fractionen aus 15 und 24 Monate alten Tieren substantielle Mengen des A β (N3pE)-Peptides nachgewiesen werden (Abb. 10B). Die Proben mussten um ein 1000faches konzentrierter, als für den Nachweis von A β (1-x) Peptiden, aufgetragen werden. Eine Abschätzung der Mengen erfolgte hier über einen synthetischen A β (N3pE)-40 Standard wie unter 3.1 für die C-terminalen A β -Peptidvarianten beschrieben. Diese ergab für 15 Monate alte APP23 Mäuse 50 ± 14 pg/mg Feuchtwicht (MW \pm SD, n = 5) und für 24 Monate alte Tiere 470 ± 138 pg/mg Feuchtwicht (MW \pm SD, n = 8). Die Menge an A β (N3pE) in APP23 Mäusen betrug somit ca. 0,1% der A β -Gesamtmenge. Auffällig war, dass in den APP23 Mäusen multiple Banden mit dem gegen A β (N3pE) gerichteten

Antikörper nachgewiesen wurden. Dies wurde auch im mit dem A β (N3pE) Antikörper gefärbten 2D-Blot deutlich, in dem mehrere übereinander laufende und schnell migrierende Spots bei einem pI von ca. 6,2 erkennbar waren (Abb. 10C).

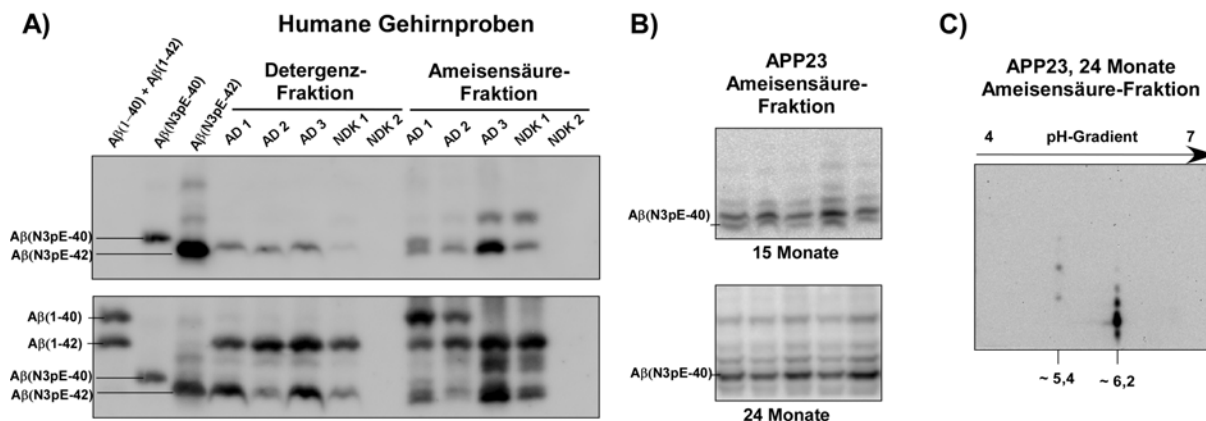


Abb. 10: A β (N3pE) ist reichlich in humanen Plaques, aber nur zu geringen Anteilen in APP23 Mäusen vorhanden.

Humane und APP23 Gehirnprouben wurden durch Harnstoff SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit dem polyklonalen Antikörper A β (N3pE) gefärbt. A) Nach spezifischer Färbung von A β (N3pE) in den humanen Proben (oberes Bild) wurde der Blot mit dem monoklonalen Antikörper 6E10 nachgefärbt, der sowohl A β (1-x) als auch A β (N3pE)-Peptide erkennt (unteres Bild). In den ersten drei Spuren wurden synthetische Peptide geladen: je 500 pg A β (1-40) und A β (1-42); je 200 pg A β (N3pE-40) und A β (N3pE-42). Von den Detergenz-Fractionen wurden je 5 μ g Gesamtprotein und von den Ameisensäure-Fractionen je 10 μ l einer 1:20 Verdünnung auf das Gel geladen. B) A β -Peptide aus den Ameisensäure-Fractionen von 15 und 24 Monate alten APP23 Mäusen. Je 5 μ l einer 1:10 (15 Monate) bzw. einer 1:100 Verdünnung (24 Monate) wurden auf ein Gel geladen. C) 2DE Blot von einer Ameisensäure-Fraktion einer APP23 Maus, 24 Monate alt (10 μ l einer 1:10 Verdünnung) angefärbt mit dem A β (N3pE) Antikörper. AD = Probe von einem Patienten mit Alzheimer Demenz. NDK: Nicht demente Kontrollprobe.

3.1.4 A β -Peptidmuster in CSF von APP23 Mäusen

Ein Biomarker für die Amyloidakkumulation im Menschen ist eine selektive Abnahme von löslichem A β (1-42) im CSF (Lewczuk und Wiltfang, 2008). Um festzustellen ob sich die beginnende oder fortschreitende Entwicklung der amyloiden Ablagerungen in APP23 Mäusen ebenfalls in biologischen Proben widerspiegelt, wurden die A β -Peptide im CSF von 3, 7 und 15 Monate alten Mäusen untersucht. In allen Altersgruppen war, vergleichbar zu humanem CSF, ein A β -Peptid Quintett, bestehend aus A β (1-40), A β (1-42), A β (1-39), A β (1-38) und A β (1-37) sichtbar (Abb. 11A). Die A β -Peptidbanden wurden wie in 3.1 beschrieben quantifiziert und die A β (1-42)/(1-40) Verhältnisse berechnet. Die Gesamtkonzentration der A β -Peptide im CSF von APP23 Mäusen war etwa sechsmal höher als in humanem CSF und das A β (1-42)/(1-40) Verhältnis entsprach mit 0,20 dem im CSF von humanen nicht dementen

Kontrollen (Tabelle 4). Weder die Gesamtmengen noch die Verhältnisse von A β (1-42)/(1-40) unterschieden sich statistisch signifikant in den drei untersuchten Altersgruppen. Zusätzliche A β -Peptidvarianten konnten durch 2DE in keiner der untersuchten CSF Proben aus APP23 Mäusen gefunden werden (repräsentativer Blot Abb. 11B).

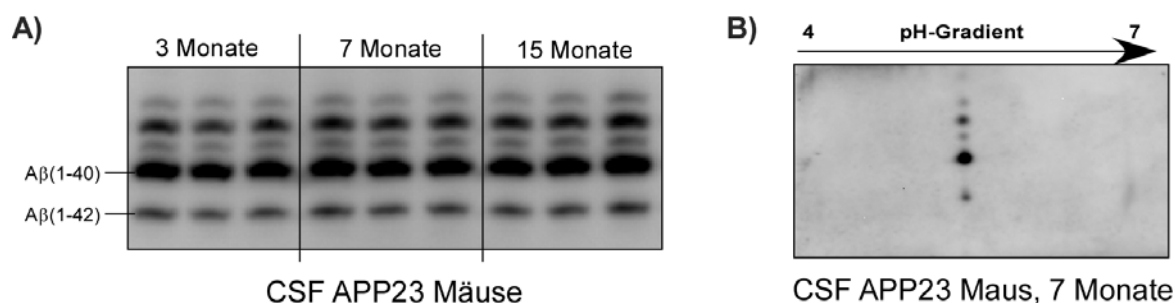


Abb. 11: A β -Peptidmuster im CSF von APP23 Mäusen.

CSF-Proben von 3, 7 und 15 Monate alten APP23 Mäusen wurden durch Harnstoff SDS-PAGE/Western-Blot mit dem Antikörper 1E8 analysiert. A) 1D Blots von repräsentativen CSF Proben von APP23 Mäusen. Die Positionen von A β (1-40) und A β (1-42) sind auf der linken Seite des Blots markiert. B) Repräsentativer 2D Blot von einer 7 Monate alten APP23 Maus.

Tabelle 4: A β -Peptide im CSF von APP23 Mäusen und Vergleich zu humanen Werten.

	APP23 Mäuse [#]			Mensch [*]	
	3 Monate (n=4)	7 Monate (n=5)	15 Monate (n=5)	NDK	AD
Gesamt A β (ng/ml)	63 \pm 13	69 \pm 11	68 \pm 11	11 \pm 5	11 \pm 4
A β (1-42)/(1-40)	0,20 \pm 0,04	0,21 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04	0,21 \pm 0,08	0,10 \pm 0,02

[#] A β -Peptide aus dem CSF der APP23 Mäuse wurden über Harnstoff SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit dem 1E8 Antikörper nachgewiesen. Die berechneten A β -Gesamtmengen ergeben sich aus der Summe von A β (1-42), -(1-40), -(1-39), (1-38) und -(1-37). ^{*} Die Werte für die humanen CSF Proben wurden aus einer Studie entnommen, für die die in dieser Arbeit verwendeten Methoden benutzt wurden (Bibl et al., 2006). Es sind jeweils MW \pm SD (n = 23 für jede Gruppe) angegeben. NDK = nicht demente Kontrollen; AD = Patienten mit Alzheimer Demenz.

3.1.5 Identifizierung der Haupt A β -Peptide aus APP23 Mausgehirnen durch Massenspektrometrie

Um die aufgetrennten A β -Peptide aus den Gehirnen von APP23 Mäusen eindeutig zu identifizieren und mögliche Modifikationen aufzudecken, wurden verschiedene massenspektrometrische Methoden angewendet. Dazu wurden Ameisensäure-Fractionen von 24 Monate alten APP23 Mäusen über eine 2DE aufgetrennt. Um die Löslichkeit in der Rehydrierungslösung zu verbessern und größere Mengen auf ein Gel zu laden, hatte es sich bewährt, die nach der Extraktion in Ameisensäure eingetrockneten Peptide zunächst in SDS-

Probenpuffer 5 min unter Schütteln aufzukochen und diese Lösung mit Rehydrierungslösung zu verdünnen. SDS kann mit der IEF interferieren, weshalb die Konzentration immer unter 0,25% liegen und ein Zwitterion im 8fachen Überschuss vorliegen sollte (GE Healthcare, 2010). Diese Richtlinien wurden eingehalten, da die SDS-Endkonzentration immer unter 0,1% lag und die des Zwitterion CHAPS die von SDS um ein 20faches überstieg. Abb. 12 zeigt ein repräsentatives Bild eines Coomassie-gefärbten 2D Gels einer Ameisensäure-Fraktion einer 24 Monate alten APP23 Maus. In dieser Fraktion waren, zusätzlich zu den erwarteten A β -Peptidspots, nur wenige andere Proteinspots zu sehen, die sich alle im oberen Drittel des Gels befanden. Im Trennungsbereich der A β -Peptide konnte eine saubere Auftrennung erreicht werden. Die betreffenden, in Abb. 12 markierten Spots, wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach Extraktion der Peptide aus dem Gel mit MALDI-TOF analysiert. Aufgrund der erhaltenen Massen wurden alle Spots als A β -Peptide identifiziert.

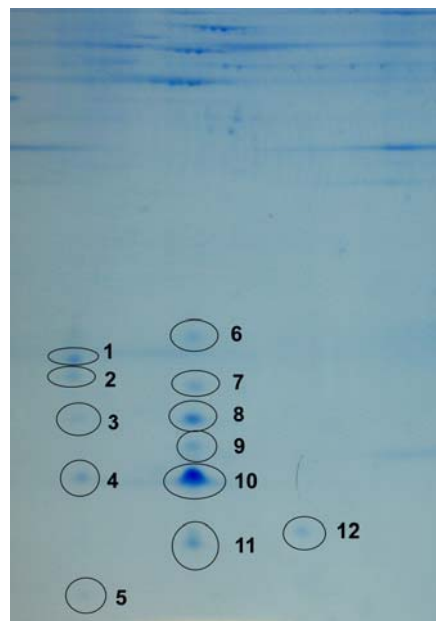


Abb. 12: Eine repräsentative 2DE der Ameisensäure-Fraktion einer 24 Monate alten APP23 Maus.

Die Probe wurde durch 2DE (linearer pH-Gradient 4-7) aufgetrennt. Für die zweite Dimension wurde eine Harnstoff A β -SDS-PAGE verwendet. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt.

Tabelle 5 fasst alle analysierten Spots mit den zugehörigen Massen zusammen. Der am stärksten gefärbte Spot Nr. 10 bei pI 5,4 hatte eine Masse von 4329,4 Da, die der von A β (1-40) entspricht. Zusätzlich konnten in dieser Reihe noch Spots als A β (1-42), -(1-39), -(1-38) und -(1-37) erkannt werden. Alle Peptide wurden sowohl im oxidierten als auch im nicht oxidierten Zustand nachgewiesen, erkennbar an der zusätzlichen Masse von 16 Da (kursiv gedruckte Massen in Tabelle 5). Für eine Oxidation kommt das oxidationssensitive

Methionin an Position 35 in Frage. Spot 6 (hier bezeichnet als A β (1-40)ox) zeigte eine reduzierte elektrophoretische Mobilität. Dies wurde für oxidierte A β -Peptide in Harnstoff Gelen bereits beschrieben (Bibl et al., 2006; Güntert et al., 2006). Demnach handelt es sich hierbei um A β , das bereits vor der Elektrophorese oxidiert vorlag, wohingegen alle anderen Spots wahrscheinlich während der experimentellen Arbeitsschritte, z.B. der Elektrophorese, der Fixierung, der Färbung, der Gelextraktion oder der massenspektrometrischen Analyse oxidiert wurden.

Tabelle 5: Identifizierte A β -Peptide und ihre relativen Molekularmassen (Mr) aus Ameisensäure-Fractionen von 24 Monate alten APP23 Mäusen.

pI	Spot [#]	A β -Peptid	Mr berechnet	Mr beobachtet *
4,7	1	A β (1-40) +28	4357,9	4357,9
		A β (1-40) + 44	4373,9	4373,6
	2	A β (1-40) + 28	4357,9	4356,7
		A β (1-40) + 43	4372,9	4372,9
	3	A β (1-38) + 28	4159,6	4160,2
		A β (1-38) + 44	4175,6	4175,9
	4	A β (1-40) + 28	4357,9	4356,5
		A β (1-40) + 43	4372,9	4372,0
	5	Maus A β (1-40)	4233,8	4235,8
				42351,3
5,4	6	A β 1-40ox	4345,8	4346,8
	7	A β 1-37	4074,5	4075,2
				4091,1
	8	A β 1-38	4131,6	4131,5
				4147,9
	9	A β 1-39	4230,7	4230,2
				4246,3
	10	A β 1-40	4329,9	4329,4
				4345,5
6,2	11	A β 1-42	4514,1	4515,9
				4531,8
	12	A β 2-40	4214,8	4216,8
		A β 3-40	4143,7	4232,6
				4145,6
				4161,7

[#] Die Nummerierung der Spots entspricht der auf dem in Abb. 12 gezeigten 2D-Gel. * Die in kursiv angegebenen Massen entsprechen den Peptiden, die am Methionin 35 oxidiert sind, was zu einer Massenzunahme von 16 Da führt. A β (1-40)ox wurde vor der Auftrennung oxidiert und lief deshalb in der zweiten Dimension oberhalb der anderen Peptide.

Spot 12 bei einem pI von ca. 6,2 enthielt zwei Peptide, A β (2-40) und A β (3-40). Eine Auftrennung dieser Peptide war nicht möglich, da die Abspaltung des ungeladenen Alanins an Position 2, keine weitere Veränderung des pIs bewirkt. Im Vergleich zu den Western-Blots trat im Coomassie-gefärbten Gel nur ein zusätzlicher Spot, die Nr. 5, auf. Dieser hatte eine Masse von 4235,8, die gut übereinstimmt mit der des endogenen A β (1-40) der Maus. Das

murine A β -Peptid hat zudem einen um ca. 0,5 saureren theoretischen pI-Wert als humanes A β , so dass anzunehmen ist, dass es sich hier tatsächlich um das endogene Maus Peptid handelt, das sich zusammen mit den überexprimierten humanen Peptiden ablagert. Bei den Spots 1 - 4, alle mit einem pI von ca. 4,7, handelte es sich um A β (1-40) und A β (1-38) mit einer Massendifferenz von +28, +43 oder +44. Die Massendifferenz +44 könnte auch als +28 +16 (Oxidation) interpretiert werden.

3.1.6 Bestimmung der Position und der chemischen Modifikation der A β -Spots bei pI 4,7

Um die exakte Position der Proteinmodifikation aufzuklären, die bei einem Teil der A β -Peptide eine Verschiebung des pIs von ca. 5,4 auf ca. 4,7 verursachte, wurden die Spots auf Höhe von A β (1-40) bei pI 4,7 und bei pI 5,4 (Spot 4 und 10 in Abb. 12) ausgeschnitten und im Gel mit der Endoproteinase Lys-C verdaut. Die resultierenden Fragmente wurden mit MALDI-TOF analysiert. Als Kontrolle wurde gelöstes rekombinantes A β (1-40) ebenfalls mit Lys-C verdaut. Lys-C spaltet Peptide spezifisch C-terminal an Lysinen, so dass aus den A β -Peptiden drei Fragmente entstehen: 1-16, 17-28 und 29-40. Die Fragmente 17-28 und 29-40 waren für das rekombinante A β (1-40), sowie für die beiden Spots aus dem 2D Gel der APP23 Mausprobe, in ihren Massen identisch und stimmten mit den theoretischen Massen überein. Sie wiesen somit keine Modifikationen auf. Das N-terminale A β -Fragment 1-16 aus Spot 10 (pI 5,4) sowie das aus rekombinantem A β (1-40) zeigten ebenfalls identische Massen von 1955 Da, was der berechneten Masse des unmodifizierten Peptidfragmentes entspricht. Das A β (1-16) Fragment aus Spot 4 (pI 4,7) hatte zwei hauptsächliche Massen, 1983 Da (1955 + 28) und 1998 Da (1955 + 43). Diese Lys-C-Spaltprodukte aus dem Spot 4, sowie das Peptid mit einer Masse von 1955 Da aus dem Spots 10 wurden weiterhin mit MS/MS analysiert (Abb. 13). Eine teilweise Sequenzierung der Peptide konnte anhand der b- und y-Ionen vorgenommen werden. Die Nummerierung der y-Ionen erfolgt vom C-Terminus, die der b-Ionen vom N-Terminus des Peptides. In Abb. 14 sind die Massen der gefundenen b- und y-Ionen der drei Peptide aufgelistet, und die Zuordnung zu der Aminosäure-Sequenz des A β -Peptides (1-16) dargestellt. Die y-Ionen waren bis zum y₁₅ identisch zu denen des unmodifizierten 1955 Peptides, nur das y₁₆-Ion enthielt die zusätzliche Masse von 28 Da bzw. 43 Da. Unter den b-Ionen zeigte das b₇-Ion das stärkste Signal und enthielt, genau wie die weiteren identifizierten b-Ionen die Massendifferenz von +28 bzw. +43 (Abb. 13 und 14). Dies lokalisiert die Modifikation eindeutig an das Aspartat in Position 1 des A β -Peptides.

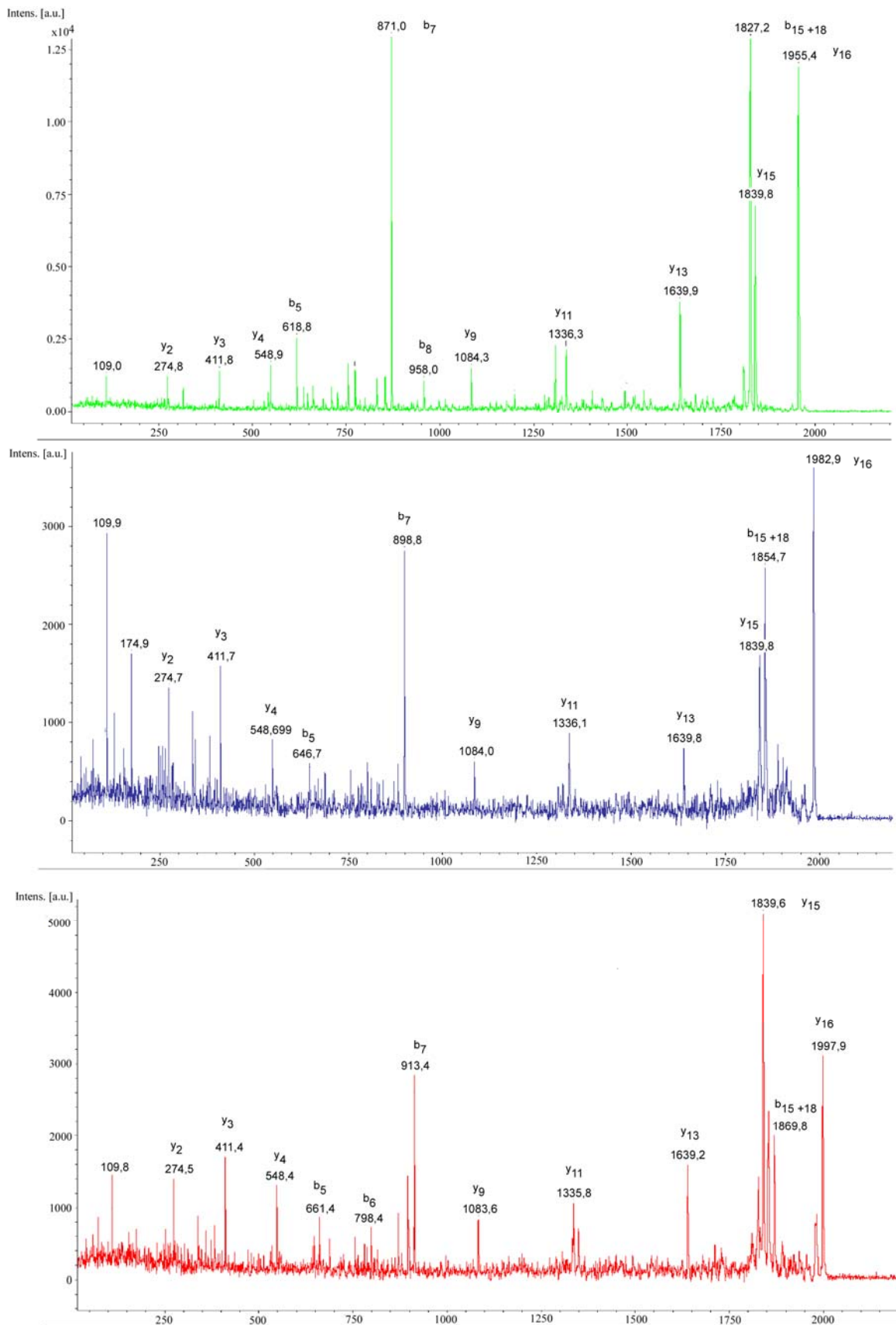


Abb. 13: MS/MS-Analysen der A β (1-16) Peptide nach Lys-C-Verdau aus einer APP23 Ameisensäure-Fraktion.

Das 1955 Peptid (grünes Spektrum, oben) entstammt Spot 10 bei pI 5.4. Das 1983 Peptid (blaues Spektrum, Mitte), sowie das 1998 Peptid (rotes Spektrum, unten) wurden aus dem Spot 4 mit einem pI von 4,7 extrahiert.

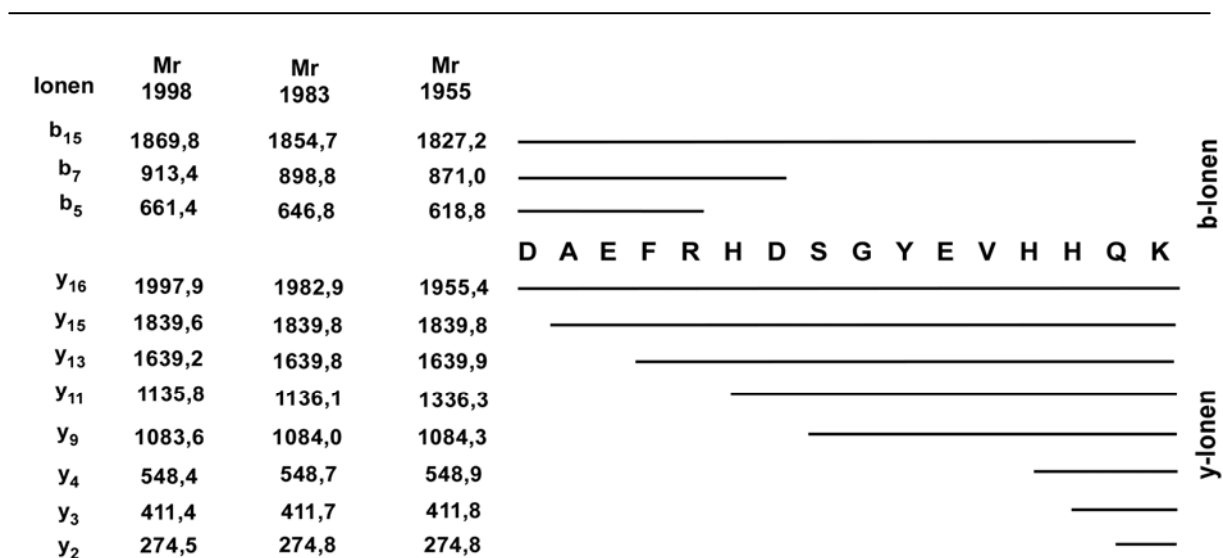


Abb. 14: Identifizierung der Position der Modifikationen anhand der b- und y-Ionen im MS/MS Spektrum.

Es werden die Massen der identifizierten b- und y-Ionen für die Lys-C Spaltprodukte mit einer relativen Molekularmasse von 1955, 1983 und 1998 gezeigt. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben Code für Aβ(1-16) angegeben. Die Balken markieren die Aminosäuresequenz der entsprechenden Ionen.

Die zusätzliche Masse von 43 Da könnte durch eine Carbamylierung während der Rehydrierung des IPG-Streifens mit der Probe erklärt werden. Harnstoff kann in einem temperaturabhängigen Prozess zu dem Carbamylion zerfallen, das Amidgruppen von Peptiden carbamyliert. Die Modifikation von +28 Da könnte durch zwei verschiedene chemische Gruppen erklärbar sein: Formylierung und Dimethylierung. Aβ-Peptide mit einer zusätzlichen Masse von 28 wurden bereits beschrieben und als artifizielle Formylierung aufgrund der Behandlung mit Ameisensäure gedeutet (Castano et al., 1996; Kalback et al., 2002; Kuo et al., 2001). Um dies experimentell zu überprüfen wurden synthetische Aβ(1-16) Peptide von Dr. Olaf Jahn vom Max-Planck-Institut aus Göttingen hergestellt. Die Peptide lagen entweder unmodifiziert vor oder trugen am Aspartat an Position 1 eine N-Formylierung, eine N,N-Dimethylierung oder eine N-Carbamylierung. Sie wurden isoelektrisch fokussiert und mit Serva Violett 17 gefärbt. Die N-Formylierung und die N-Carbamylierung induzierten eine pI Verschiebung zu einem saureren pH-Wert im Vergleich zu dem unmodifizierten Aβ(1-16). Das Peptid mit der N,N-Dimethylierung hingegen zeigte keinen veränderten pI-Wert (Abb. 15). Die synthetischen Peptide N-Formyl-Aβ(1-16) bzw. N-Carbamyl-Aβ(1-16) wurden durch „collision induced decay“ fragmentiert und mit MS/MS analysiert. Die charakteristischen Peaks im Massenspektrum des synthetischen N-Formyl-Aβ(1-16) Peptides stimmten mit denjenigen aus dem MS/MS-Spektrum des Peptides mit einer Masse von 1983 Da aus der APP23 Maus überein (s. Anhang 1, Seite 121). Die gleiche Beobachtung konnte

für den Vergleich zwischen dem synthetischen N-Carbamyl-A β (1-16) und dem Peptid aus der APP23 Maus mit einer Masse von 1998 Da gemacht werden (s. Anhang 2, Seite 122). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Modifikationen am A β -Peptid die eine Verschiebung zu saureren pIs bewirkten, mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einer N-Formylierung bzw. einer N-Carbamylierung am Aspartat in Position 1 resultierten.

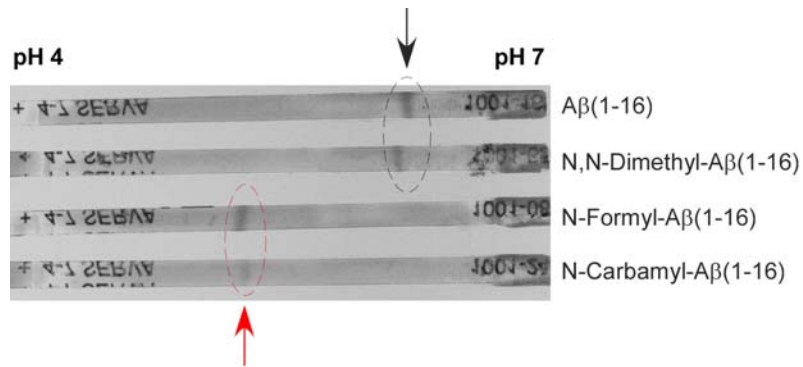


Abb. 15: Isoelektrische Fokussierung von synthetischen A β (1-16) Peptiden.

Die synthetischen Peptide A β (1-16), N,N-Dimethyl-A β (1-16), N-Formyl-A β (1-16) und N-Carbamyl-A β (1-16) wurden isoelektrisch fokussiert und mit Serva Violett 17 gefärbt. N-formylierte und N-carbamylierte Peptide (in rot eingekreist) hatten einen saureren pI als das N,N-dimethylierte und das unmodifizierte Peptid (in schwarz eingekreist).

Kontrollexperimente, bei denen rekombinante A β -Peptide für 20 min mit 70% Ameisensäure behandelt wurden, zeigten nach 2DE keine oder nur schwach ausgeprägte Spots bei pI 4,7. Eine 2D Auftrennung von A β -Peptiden (rekombinant oder als Bestandteil von anderen biologischen Proben ohne Ameisensäure-Behandlung) führte nicht zur Bildung von A β Spots mit saurem pI, obwohl Harnstoff fester Bestandteil der IEF ist. In einem Langzeitexperiment hingegen, in dem rekombinantes A β (1-40) 10 Tage bei RT entweder in 70% Ameisensäure oder in 8,3 M Harnstoff inkubiert wurde, waren „saure Spots“ deutlich sichtbar. MALDI-TOF Messungen nach Lys-C Verdau ergaben für das N-terminale Spaltprodukt die Massen 1983 Da bzw. 1998 Da für diese Spots. Dies bestätigt, dass prinzipiell durch die Verwendung von Ameisensäure und Harnstoff bei der methodischen Probenaufarbeitung die gefundenen Modifikationen entstehen könnten.

3.1.7 Alternative Methoden zur Minimierung des Risikos von artifiziellen Proteinmodifikationen

3.1.7.1 Amyloid-Extraktion mit Reinstwasser

Um eine mögliche artifizielle Formylierung auszuschließen, wurde eine alternative Extraktionsmethode gewählt, bei der weder Ameisensäure noch andere aggressive Chemikalien benutzt wurden. Diese Methode basiert auf einem Protokoll, das von Pras und Kollegen für die Extraktion von Amyloidfibrillen aus einer Milz bei einer peripheren Amyloidose entwickelt wurde (Pras et al., 1968). Hierbei werden zunächst die löslichen Proteine durch mehrmaliges Homogenisieren in einer Salzlösung entfernt, dann werden in einem zweiten Schritt die Amyloidfibrillen mit Reinstwasser extrahiert. Eine Amyloid-Extraktion nach Pras wurde mit einer Gehirnhälfte einer 24 Monate alten APP23 Maus durchgeführt. In Abb. 16A sind die UV-Absorptionswerte bei 280 nm, in Abb. 16B die zugehörigen A β Western-Blots der einzelnen Fraktionen dargestellt. In den ersten 3 - 4 Salzextrakten waren A β -Peptide zu finden, die eine hoch lösliche Fraktion abbildeten. Nur geringste Mengen waren in dem ersten H₂O-Extrakt nachweisbar, in dem die Ionenstärke wahrscheinlich noch relativ hoch war. Große Mengen an A β -Peptiden wurden in den H₂O-Fractionen 2 - 5 extrahiert. Dieses Extraktionsmuster ist übereinstimmend mit dem von Pras beschriebenen (Pras et al., 1968). Ein Hauptmerkmal von Amyloid Proteinen ist ihre im Elektronenmikroskop sichtbare fibrilläre doppelhelikale Struktur (Cohen und Calkins, 1959; Shirahama und Cohen, 1967). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach negativer Kontrastierung konnte gezeigt werden, dass die H₂O-Extrakte fibrilläres Amyloid enthielten, das eine typische schraubenförmige Struktur aufwies (Abb. 16C). Ein 2D Blot des zweiten H₂O-Extraktes zeigte ein Muster an A β -Peptiden, das vergleichbar war zu den 2D Blots aus Ameisensäure-Fractionen: A β -Peptide mit pIs von etwa 4,7, 5,4 und 6,2 waren klar zu erkennen (Abb. 16D). Die „sauren“ A β Spots aus den APP23 Mäusen entstehen also nicht ausschließlich durch Ameisensäure Behandlung.

3.1.7.2 2DE ohne Harnstoff

Um die artifizielle Entstehung von „sauren Spots“ aus der H₂O-Fraktion durch Carbamylierung während der IEF auszuschließen, wurde in einem Kontrollexperiment der Harnstoff sowohl bei der IEF als auch bei der anschließenden SDS-PAGE weggelassen. Die Funktion des Harnstoffs wurde dabei, zumindest teilweise, durch das zwitterionische Detergenz CHAPS kompensiert, dessen Konzentration von 2% auf 4% erhöht wurde.

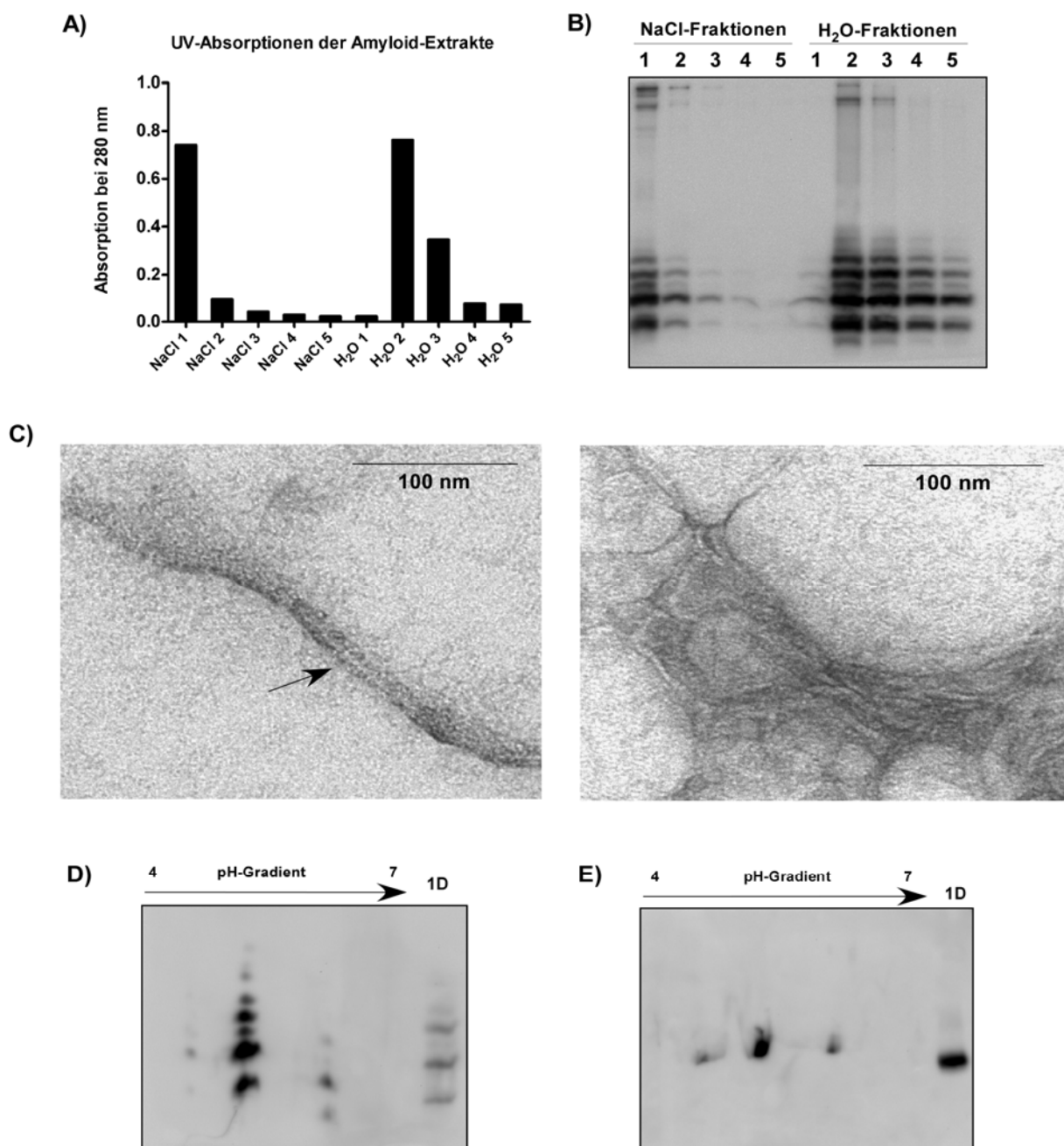


Abb. 16: Amyloid-Extraktion nach Pras eines Gehirns einer 24 Monate alten APP23 Maus.

A) UV-Absorption bei 280 nm der NaCl- und H₂O-Fraktionen aus der Pras-Extraktion. B) Harnstoff SDS-PAGE und Western-Blot mit den NaCl- und H₂O-Fraktionen der Pras-Extraktion. Der Blot wurde mit dem Antikörper 1E8 gefärbt. C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen des zweiten H₂O-Extraktes. Linkes Bild: Fixierung des Materials mit 0,2% Glutardialdehyd und Färbung mit 2% Uranylacetat; der Pfeil deutet auf eine doppelhelikale Struktur zweier umeinander gewundener Fibrillen. Rechtes Bild: Die A β -Fibrillen wurde auf einem Träger mit 10 mM CaCl₂ präzipitiert und mit 1% Phosphorwolframsäure, pH 7,5 gefärbt. D) Der zweite H₂O-Extrakt aus der Pras-Extraktion eines APP23 Gehirns wurde durch 2DE aufgetrennt. Der anschließende Western-Blot wurde mit 1E8 angefärbt. E) Der für die 2DE in D) verwendete H₂O-Extrakt wurde ebenfalls durch 2DE aufgetrennt, jedoch ohne die Verwendung von Harnstoff für die erste oder zweite Dimension. Für die IEF wurde eine Rehydrierungslösung mit 4% CHAPS benutzt. In die 1D-Spur in D und E) wurden synthetische A β -Peptide geladen. 1D = eindimensionale Auftrennung synthetischer A β -Peptide.

Für die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde das Bicine/Bis-tris/Tris/Sulfat Gelsystem ohne Harnstoff verwendet, das keine Auftrennung der C-terminalen Varianten des A β -Peptides erlaubt. Unter diesen Bedingungen migrieren alle A β -Peptide in einer einzigen Bande. Mit solch einer harnstofffreien 2D-Auftrennung des zweiten H₂O-Extraktes konnten erneut A β -Peptide mit einem pI von ca. 5,4 und ca. 6,2, sowie geringe Mengen an einer A β -Variante nachgewiesen werden, dessen pI Wert deutlich saurer war (Abb. 16E). Die Versuche einer Massenbestimmung der N-Termini der verschiedenen A β -Peptide aus diesen H₂O-Extrakten nach harnstofffreier 2DE, und somit deren eindeutige Charakterisierung waren nicht erfolgreich. Sowohl die Extraktion nach Pras, als auch die harnstofffreie 2DE führten zu deutlich geringeren Ausbeuten, im Vergleich zu den vorher benutzten und aggressiveren Methoden. Es gelang nicht, eine ausreichende Menge an Material auf ein 2D Gel zu laden, um die entsprechenden Spots mit Coomassie anzufärben. Erschwerend kam hinzu, dass die H₂O-Extrakte zusätzliches, vermutlich mit den Amyloidfibrillen assoziiertes Material, enthielten, was die Auftrennung im 2D-Gel verschlechterte.

3.2 Methodische Aspekte der 2DE: Kreuzkontaminationen durch A β -Peptide

Im Rahmen von hochempfindlichen 2D-Westernblot Analysen von A β -Peptiden aus Zellkulturmodellen ergaben sich Hinweise auf mögliche Kreuzkontaminationen. Als mögliche Ursache für die Verschleppungen kam hauptsächlich eine Adsorption an die für die Rehydrierung und IEF benutzten IPG-Streifenhalter in Frage. Die hier verwendeten bestehen aus Aluminiumoxidkeramik und enthalten integrierte Elektroden für die IEF. Eine 2DE „Leerkontrolle“ ohne Probe bestätigte diesen Verdacht und eine systematische Untersuchung zu den A β -Kontaminationen und den Möglichkeiten ihrer Beseitigung wurde durchgeführt.

3.2.1 Reinigungsverfahren für IPG-Streifenhalter nach A β -Kontamination

Um die Effizienz von verschiedenen Reinigungsprozeduren zu überprüfen wurden drei IPG-Streifenhalter mit A β -Peptiden „kontaminiert“. Hierzu wurde je ein Peptid-Mix aus 240 ng A β (1-40), 120 ng A β (1-42), 120 ng A β (1-38), 60 ng A β (1-39) und 60 ng A β (1-37) isoelektrisch fokussiert, durch Harnstoff SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Ein repräsentatives Gel ist in Abb. 17A gezeigt. Wie erwartet migrierten die A β -Peptide bei einem pI von ca. 5,4. Alle IPG-Streifenhalter wurden anschließend zweimal mit dem vom Hersteller empfohlenen Reinigungsmittel (GE-Reinigungslösung), das für die pH-sensitive Oberfläche der Aluminiumoxidkeramik geeignet ist, gereinigt. Zwei der sechs Halter erfuhren

keine weitere Reinigungsprozedur, zwei weitere wurden zusätzlich für 10 min in 1% SDS aufgeköcht. Dies wird vom Hersteller für die Entfernung stark adhäsiver Proteine empfohlen (GE Healthcare, 2010). Die verbliebenen zwei Streifenhalter wurden für 20 h bei 30°C in einer Lösung mit 1% SDS und 9 M Harnstoff inkubiert. Die IPG-Streifenhalter wurden nun auf A β -Peptidreste kontrolliert. Dazu wurde jeweils eine 2D „Leerkontrolle“ durchgeführt, bei der anstatt einer Probe 10 μ l Probenpuffer für die IEF appliziert wurde. Die nachfolgenden Western-Immunoblots mit dem Antikörper 1E8 zeigten, dass bei allen drei Reinigungsansätzen noch beträchtliche Mengen an A β -Peptiden nachgewiesen werden konnten (Abb. 17B). Es ist hierbei jedoch zu beachten, dass die Nachweisempfindlichkeit im Western-Blot im pg-Bereich liegt und damit erheblich sensitiver als die der Coomassie-Färbung ist.

Anscheinend wurden durch die Reinigungsverfahren Modifikationen in den verbleibenden A β -Peptiden induziert. Das 10-minütige Aufkochen in 1% SDS führte zu dem Erscheinen von A β -Peptiden mit einem basischeren pI, die bezüglich ihres Laufverhaltens A β -Peptiden glichen, denen die erste Aminosäure Aspartat fehlt. Eine nicht-enzymatische Spaltung hinter Aspartatresten durch längeres Aufkochen in SDS wurde bereits für Tubulin beschrieben (Correia et al., 1993; Mandelkow et al., 1985). Die Inkubation in harnstoffhaltiger Lösung führte zu einem Schmier bei einem saureren pI, der wahrscheinlich durch Carbamylierungen bedingt war. Da die Reinigungsschritte offensichtlich nicht effektiv waren und zusätzliche Artefakte produzierten, wurde eine Dekontamination angewendet, die die Proteolyse durch Proteinase K beinhaltete. Die thermostabile Proteinase K, wird von dem Pilz *Tritirachium album Limber* produziert und hat eine starke proteolytische Aktivität gegen native wie auch denaturierte Proteine (Ebeling et al., 1974). Alle IPG-Streifenhalter wurden für 15 h bei 56°C in einer aktiven Proteinase K Lösung inkubiert. Zur Entfernung der Proteinase K wurden die IPG-Streifenhalter anschließend mit GE-Reinigungslösung gesäubert und 10 min in Wasser aufgeköcht, um mögliche Reste an Proteinase K zu inaktivieren. Eine 2D „Leerkontrolle“ mit nachfolgendem Western-Blot wurde erneut durchgeführt. Die Proteinase K Behandlung reduzierte die A β -Menge weitgehend, jedoch konnte keine Entfernung der A β -Peptide unter die Nachweisgrenze erreicht werden (Abb. 17C).

Die Effizienz der initialen Proteinase K Behandlung war augenscheinlich abhängig von der Vorbehandlung der IPG-Streifenhalter. Die A β -Mengen auf den Blots wurden, im Vergleich zu den Mengen an synthetischen A β -Peptiden, die in eine 1D Spur geladen wurden, mit Hilfe der QuantityOne Software abgeschätzt.

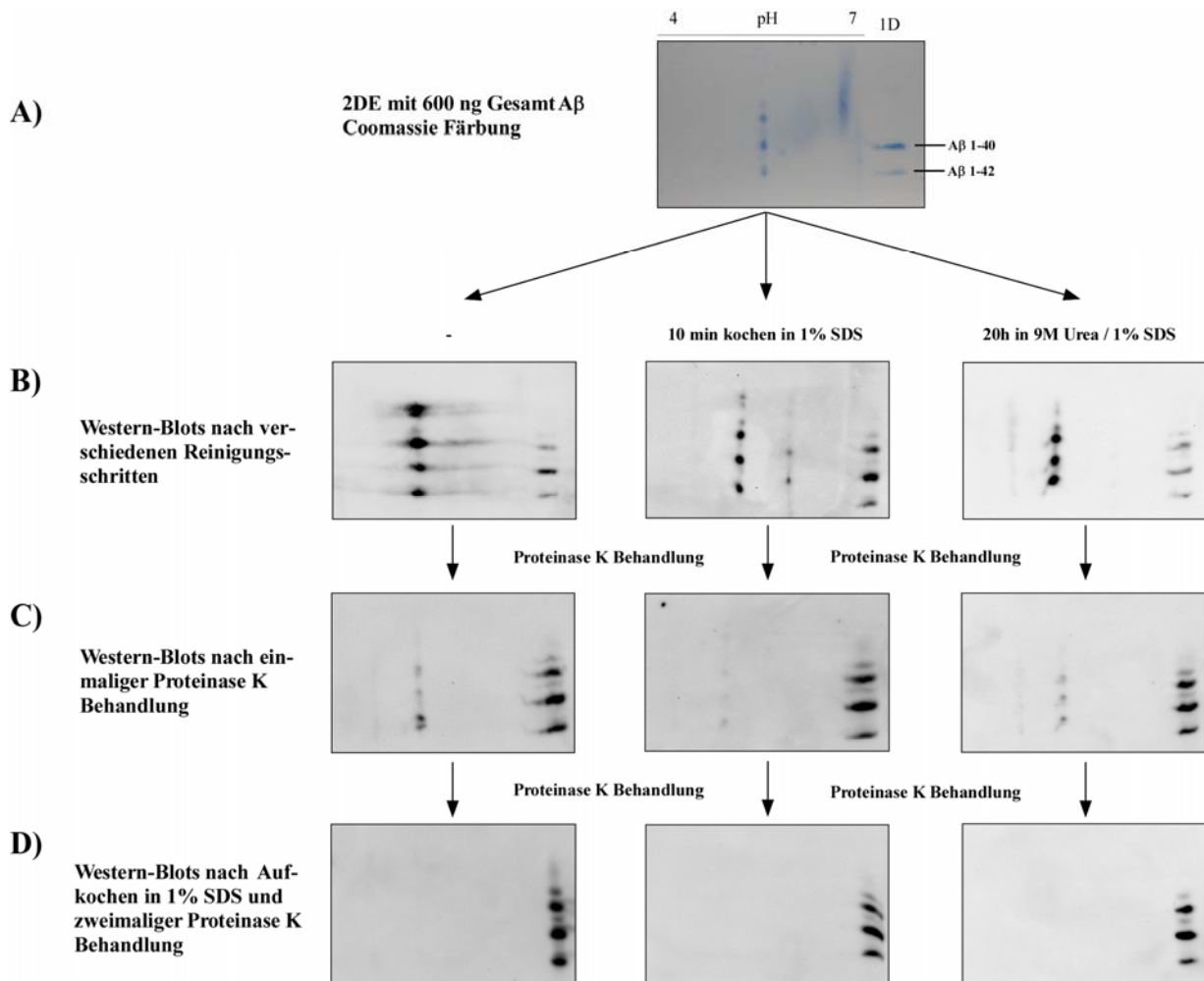


Abb. 17: Reinigungsschritte zur Entfernung von A β -Peptid Kontaminationen.

A) Je 600 ng einer A β -Peptid Mischung wurden durch 2DE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (n = 6). Je 250 ng rekombinantes A β (1-40) und A β (1-42) wurden auf der rechten Seite des Gels in eine 1D Spur aufgetragen. B) Die benutzten IPG-Streifenhalter wurden alle mit GE-Reinigungslösung gereinigt. Zusätzlich wurden je zwei IPG-Streifenhalter 10 min in 1% SDS aufgeköcht bzw. 20 h in 9 M Harnstoff, 1% SDS inkubiert. Bei einem anschließenden 2D „Leerlauf“ und Western-Blot wurden verbliebene A β -Peptide mit dem Antikörper 1E8 angefärbt. C) Alle IPG-Streifenhalter wurden mit Proteinase K behandelt und in einem 2D „Leerlauf“ im Western-Blot überprüft. D) Alle IPG-Streifenhalter wurden in 1% SDS aufgeköcht, ein zweites Mal mit Proteinase K behandelt und auf verbliebene A β -Peptiden hin überprüft. Auf allen Blots in B - D ist auf der rechten Seite in einer 1D-Spur ein Mix aus synthetischen A β -Peptiden aufgetragen (120 pg A β (1-40), 60 pg A β (1-42), 60 pg A β (1-38), 30 pg A β (1-39) und 30 pg A β (1-37)). Für jede Bedingung ist ein repräsentatives Gel bzw. Blot gezeigt.

In Tabelle 6 sind die abgeschätzten Mengen an verbliebenen nachweisbaren A β -Peptiden nach den verschiedenen Reinigungsschritten als prozentuale Anteile der ursprünglich aufgetragenen 600 ng A β angegeben. Nach einer alleinigen Reinigung mit der GE-Reinigungslösung oder nach Inkubation in einer 9 M Harnstoff, 1% SDS-Lösung konnten noch etwa 0,1% der eingesetzten A β -Menge nachgewiesen werden, nach Aufkochen in

1% SDS nur noch etwa 0,03%. Die effizienteste Reinigung wurde durch Aufkochen in 1% SDS und nachfolgende Proteinase K Behandlung erreicht. Aufgrund dieser Befunde wurde diese Reinigungsprozedur ein zweites Mal für alle IPG-Streifenhalter durchgeführt. Danach konnten schließlich in 2D „Leerkontrollen“ keine A β -Peptide mehr nachgewiesen werden (Abb. 17D, Tabelle 6).

Tabelle 6: Geschätzte Mengen an nachweisbaren A β -Peptiden nach verschiedenen Reinigungsschritten.

	Proteinase K Behandlung *	A β -Peptid Menge #
Keine zusätzliche Reinigung	-	~0,1%
	+	~0,01%
	++	n.n.
	(Aufkochen in 1% SDS vor 2. Behandlung)	
Aufkochen in 1% SDS, 10 min	-	~0,03%
	+	~0,002%
	++	n.n.
	(Aufkochen in 1% SDS vor 2. Behandlung)	
Inkubation in 9 M Harnstoff, 1% SDS, 20 h bei 30°C	-	~0,1%
	+	~0,003%
	++	n.n.
	(Aufkochen in 1% SDS vor 2. Behandlung)	

* -: keine Proteinase K Behandlung; +: einmalige Proteinase K Behandlung; ++: zweimalige Proteinase K Behandlung. # Die A β -Peptid Mengen wurde anhand der bekannten Konzentration der synthetischen A β -Peptide, die in die 1D Spur aufgetragen wurden, abgeschätzt. Sie sind prozentual zu den 600 ng an A β -Peptiden angegeben, die anfänglich für die erste IEF eingesetzt wurden; n.n.: nicht nachweisbar.

3.2.2 Einfluss des Oberflächenmaterials auf die A β -Adhäsion und -Aggregation

Die Kinetik der A β -Aggregation *in vitro* ist abhängig von den physikochemischen Eigenschaften des Oberflächenmaterials, mit dem die A β -Peptide in Kontakt treten (Kowalewski und Holtzman, 1999). Das Oberflächenmaterial der verwendeten IPG-Streifenhalter könnte demnach einen Einfluß auf die Adhäsion der A β -Peptide und die beobachtete Unlöslichkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber der Behandlung mit Proteinase K haben. Um dies zu überprüfen, wurde das Kontaminationsexperiment wie oben beschrieben wiederholt, die Rehydrierung aber „off-line“ (d.h. separat von der eigentlichen Fokussierung) in drei verschiedenen Haltern durchgeführt: 1. In einem Aluminiumoxid-keramikhalter (GE Healthcare, wie in den oben beschriebenen Experimenten); 2. In einem IPG-Streifenhalter aus Teflon (hergestellt durch die Werkstatt des Universitätsklinikums Essen); 3. In einem aus Polystyrol bestehenden Einweg-IPG-Streifenhalter (BioRad). Nach der Rehydrierung für 15 h bei RT wurden die IPG-Streifen für die IEF in einen separaten

Halter aus Aluminiumoxidkeramik transferiert. Alle benutzten IPG-Streifenhalter wurden anschließend mit der GE-Reinigungslösung gereinigt, und es wurde ein 2D „Leerlauf“ durchgeführt. Wurde die „Off-line“ Rehydrierung in einem IPG-Streifenhalter mit einer Aluminiumoxidoberfläche durchgeführt, waren A β -Peptide nach einem Leerlauf nachweisbar (Abb. 18A). Diese A β -Peptide waren jedoch nicht resistent gegenüber Proteinase K und konnten durch Aufkochen in 1% SDS entfernt werden. In den IPG-Streifenhaltern aus Teflon bzw. Polystyrol wurden keine verbliebenen A β -Peptide nachgewiesen (Abb. 18A). In denjenigen IPG-Streifenhaltern (Aluminiumoxidkeramik), die für die eigentliche IEF benutzt wurden, waren nach den Kontroll „Leerläufen“ A β -Peptide nachweisbar, unabhängig davon in welche Haltern der IPG-Streifen zuvor rehydriert worden war (Abb. 18B). Diese A β -Peptide konnten nur durch zweimalige Proteinase K Behandlung entfernt werden.

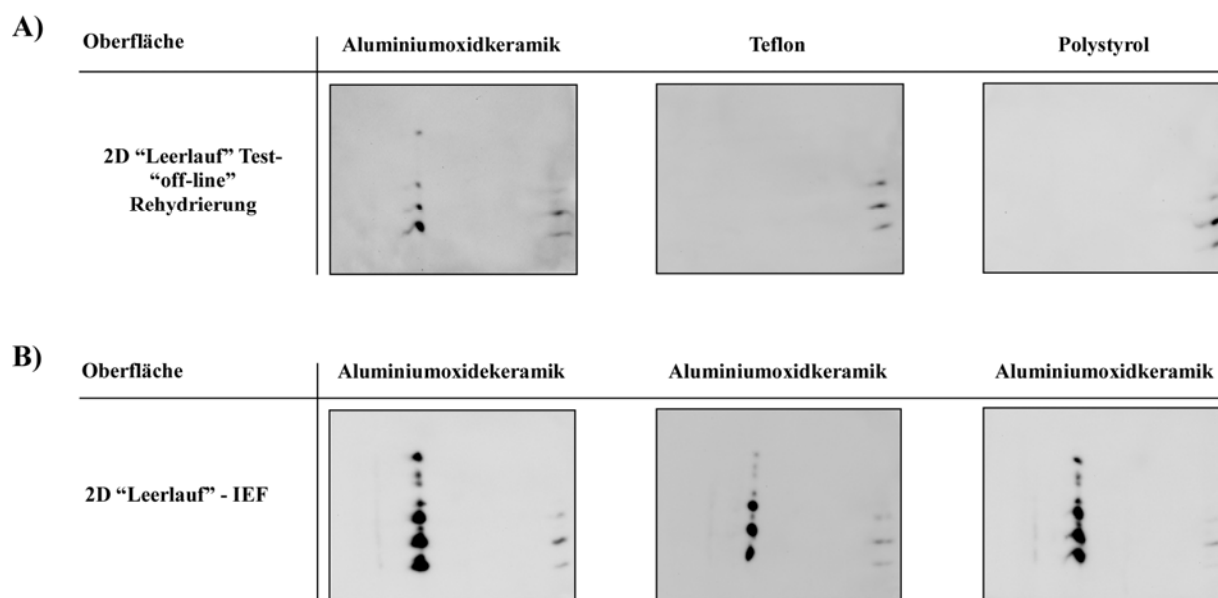


Abb. 18: Untersuchung der Oberflächenabhängigkeit der A β -Peptid Verschleppung.

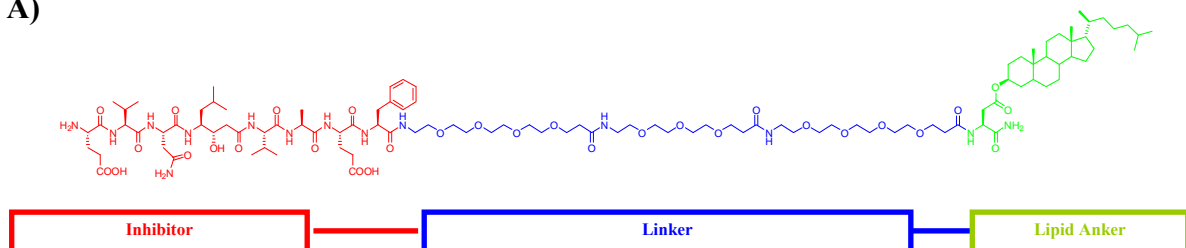
Drei IPG-Streifen wurden „off-line“ mit einem synthetischen A β -Peptid Mix (600 ng) in IPG-Streifenhaltern aus drei verschiedenen Oberflächen rehydriert: 1) Aluminiumoxidkeramik 2) Teflon 3) Polystyrol. Die Streifen wurden dann für die IEF in Aluminiumoxidkeramik IPG-Streifenhalter übertragen. Alle Halter wurden mit GE-Reinigungslösung gereinigt und auf verbleibende A β -Peptide in einem „Leerlauf“ überprüft. A) 2D Blots der „Leerläufe“ mit den IPG-Streifenhaltern, die für die Rehydrierung benutzt wurden. B) 2D Blots der „Leerläufe“ mit den IPG-Streifenhaltern, die für die nachfolgende IEF benutzt worden waren.

3.3 Modulation der A β -Peptid Sekretion mit einem membranverankerten β -Sekretase Inhibitor

3.3.1 Aufbau der „Tripartite“ Substanzen

Das Konzept der „Tripartite“ Substanzen wurde entwickelt, um die Wirksamkeit von Inhibitoren von BACE oder anderen Enzymen, die sich in intrazellulären membranösen Kompartimenten befinden, zu verbessern, indem die Pharmakophore selektiv in Membranamikrodomänen („Lipid-Rafts“) angereichert werden (Braxmeier et al., 2005). Die Namensgebung ergibt sich durch die dreigliedrige modulare Struktur. Ein Modul ist das Pharmakophor, ein BACE-Inhibitor (rot in Abb. 19A), ein weiteres ein Lipid-Anker (grün in Abb. 19A), der der Verankerung und Anreicherung der Substanzen in Membranen dient. Das dritte Modul ist ein Linker (blau in Abb. 19A), der die beiden zuvor genannten verbindet und den Inhibitor in einem optimalen Abstand zu der Membran und dem Zielenzym positionieren soll. Die verschiedenen Module, sowie die einzelnen Elemente des Linkers, sind durch Peptidverbindungen verknüpft, so dass die gesamte Substanz durch Festphasen-Peptidsynthese hergestellt werden kann. Dies ermöglicht einen relativ einfachen Austausch der verschiedenen Module und die Synthese verschiedenster Substanzen mit dem gleichen Grundgerüst. Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

A)



B)

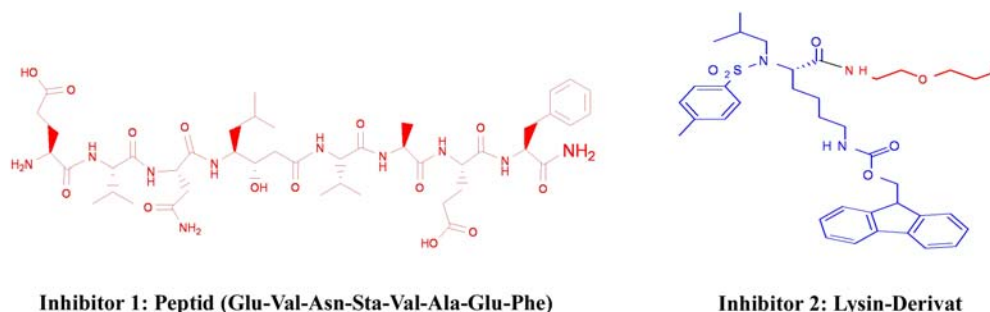


Abb. 19: Strukturaufbau der „Tripartite“ Substanzen.

A) Schematische Darstellung des Aufbaus der „Tripartite“ Substanzen mit ihren drei Modulen Inhibitor (rot), Linker (blau) und Lipid-Anker (grün). B) Pharmakophore die in dieser Arbeit verwendet wurden: Inhibitor 1 (Peptid-Analog) und Inhibitor 2 (Lysin-Derivat).

Tabelle 7: Strukturen, Formeln und Molekularmassen (M) der „Tripartite“ Substanzen.

Nr.	Struktur #	Formel	M [g/mol]	Linker [Å]	Anker
1	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₇₅ H ₁₂₁ N ₁₁ O ₁₇	1448,8	0	Cholesterol
2	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₈₆ H ₁₄₂ N ₁₂ O ₂₂	1696,1	18	Cholesterol
3	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-3GI-4GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₉₅ H ₁₅₉ N ₁₃ O ₂₆	1899,4	35	Cholesterol
4	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-3GI-3GI-3GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₁₀₂ H ₁₇₂ N ₁₄ O ₂₉	2058,5	47	Cholesterol
5	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-3GI-4GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₁₀₆ H ₁₈₀ N ₁₄ O ₃₁	2146,6	53	Cholesterol
6	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-3GI-3GI-3GI-3GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₁₀₉ H ₁₈₅ N ₁₅ O ₃₃	2233,7	63	Cholesterol
7	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-3GI-4GI-3GI-4GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₁₂₆ H ₂₁₈ N ₁₆ O ₄₀	2597,2	89	Cholesterol
8	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-3GI-4GI-3GI-4GI-3GI-4GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₁₄₆ H ₂₅₆ N ₁₈ O ₄₉	3047,7	123	Cholesterol
9	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-3GI-4GI-3GI-4GI-NH ₂	C ₉₅ H ₁₆₇ N ₁₅ O ₃₇	2111,4	89	-
10	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-3GI-4GI-3GI-4GI-Asp(Palmityl)-NH ₂	C ₁₁₅ H ₂₀₄ N ₁₆ O ₄₀	2450,9	89	Palmityl
11	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-3GI-4GI-3GI-4GI-Asp(Myristyl)-NH ₂	C ₁₁₃ H ₂₀₀ N ₁₆ O ₄₀	2422,9	89	Myristyl
12	H-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe-4GI-3GI-4GI-3GI-4GI-Asp(Oleyl)-NH ₂	C ₁₁₇ H ₂₀₆ N ₁₆ O ₄₀	2477,0	89	Oleyl
13	Ts(<i>i</i> -Bu)-Lys(Fmoc)-3GI-3GI-3GI-Asp(Odhc)-NH ₂	C ₉₀ H ₁₄₁ N ₇ O ₂₀ S	1673,2	47	Cholesterol

Glu = Glutamat; Val = Valin; Asn = Asparagin; Sta = Statin; Ala = Alanin; Phe = Phenylalanin; Asp = Aspartat; dhc = dihydrocholesterol; 4GI = 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecansäure; 3GI = 12-amino-4,7,10-trioxadodecansäure; Ts = Tosyl (= 4-methylphenylsulfonyl); *i*-Bu = Isobutyl; Lys = Lysin; Fmoc: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

Es wurden zwei bekannte BACE Inhibitoren mit und ohne Einbau in „Tripartite“ Substanzen getestet (Abb. 19B). Bei Inhibitor 1 handelt es sich um einen Inhibitor des Übergangszustandes, der in das aktive Zentrum von BACE bindet und über eine kompetitive Inhibition wirkt. Der Inhibitor 2 ist ein Lysin-Derivat, das von Elan Pharmaceuticals identifiziert wurde (John, 2003) und dessen Wirkungsmechanismus ungeklärt ist. Die Substanzen wurden alle im Rahmen einer Kooperation an der Technischen Universität Dresden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Joachim Knölker synthetisiert.

3.3.2 Wirkungen der „Tripartite“ Strukturen auf die APP-Prozessierung

Die BACE Inhibitoren wurden in verschiedenen Zellmodellen getestet. Primäre Neuronen aus dem Telencephalon des Huhns (CTN = „chicken telencephalic neurons“) sind neuronalen Ursprungs, nicht genetisch manipuliert und spiegeln deshalb physiologische Prozesse besser wider als immortalisierte Zellen. Die APP-Sequenz des Huhns besitzt eine hohe Homologie zu der humanen und die C-terminalen 104 Aminosäuren, die auch die A β -Sequenz enthalten, sind identisch mit denen des Menschen. Zudem werden im Huhn alle Enzyme exprimiert, die zur A β -Generierung benötigt werden, darunter BACE1 (Carrodeguas et al., 2005). Als weiteres Zellmodell wurden stabil transfizierte SH-SY5Y Zellen verwendet. Die Zelllinien exprimieren humanes APP₆₉₅ Wildtyp (APPwt) oder ein mutiertes humanes APP₆₉₅ mit der schwedischen Doppelmutation (K670N/M671L) (APPsw). In diesem Zellkulturmodell konnte die schwedischen FAD Mutation untersucht werden. Ausserdem eignete sich die Zelllinie besser für die Generierung von großen Datensätzen, z.B. für die Bestimmung von Dosis-Wirkungskurven.

3.3.2.1 „Tripartite“ Substanzen reduzieren die A β -Peptid Sekretion

Die freien Inhibitoren 1 und 2, sowie die korrespondierenden „Tripartite“ Substanzen mit 47 Å Linkern und Dihydrocholesterol-Ankern (Nr. 4 und 13 in Tabelle 7) wurden in den CTN (20 h Inkubation) und SH-SY5Y APPwt und APPsw Zellen (4 h Inkubation) bei einer Konzentration von jeweils 100 nM getestet. Die A β 40 Konzentrationen wurden mit ECL Assays bestimmt und in Prozent, relativ zu der Vehikelkontrolle (1% DMSO) ausgedrückt. Die „Tripartite“ Substanzen 4 und 13 (mit beiden getesteten Pharmakophoren), reduzierten deutlich die A β 40-Sekretion in allen drei Zellmodellen (Abb. 20A und C). Die Substanz 13 (mit Inhibitor 2) schien in CTN weniger potent als in SH-SY5Y Zellen zu sein. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 1 μ M konnte jedoch in CTN der gleiche Effekt erzielt

werden, was auf eine Dosis-abhängige Inhibierung hindeutet (Abb. 20C). Die freien Inhibitoren 1 und 2 wurden weiterhin bei Konzentrationen bis zu 10 μM getestet, dies führte jedoch nicht zu einer statistisch signifikanten Erniedrigung der A β 40-Sekretion (Abb. 20B und D).

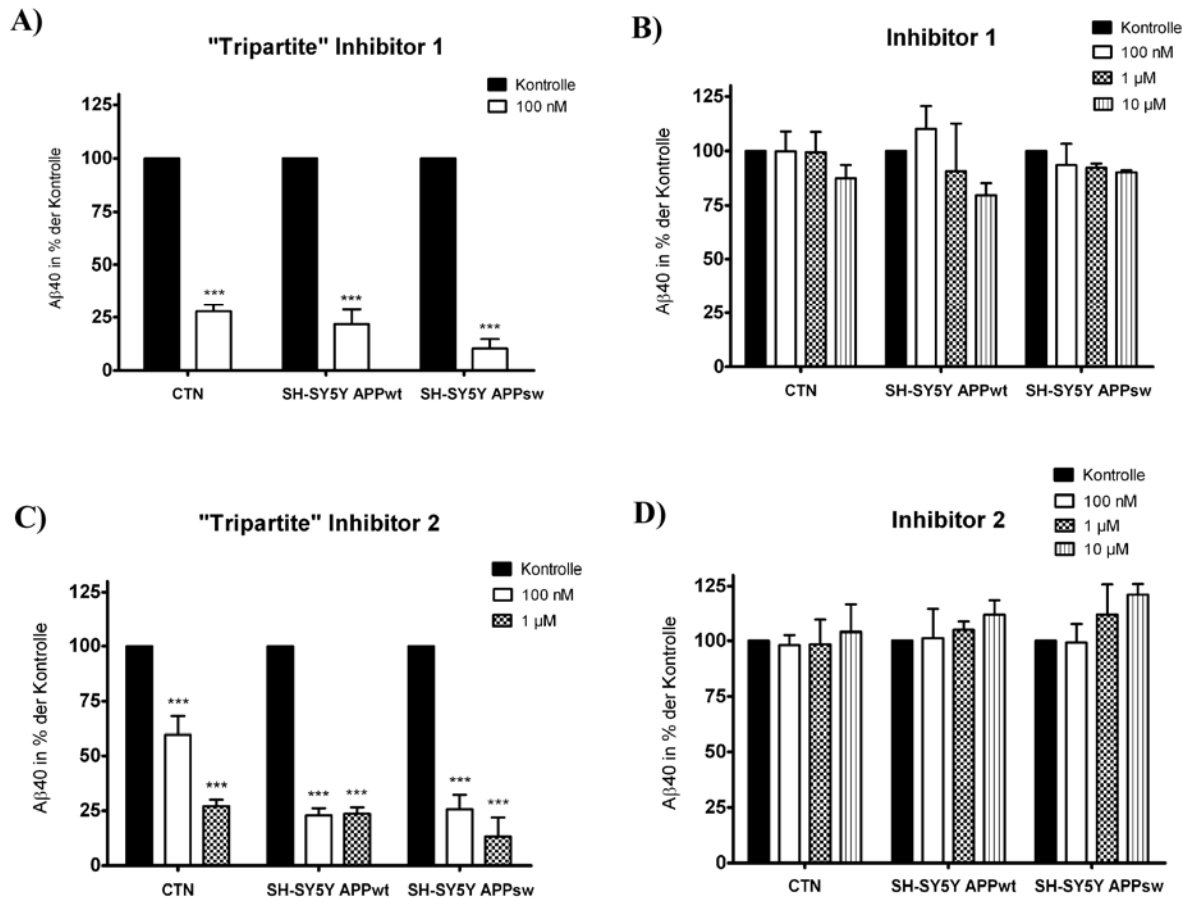


Abb. 20: Effiziente Reduktion an A β -Peptiden durch „Tripartite“ Substanzen.

Die Zellen wurden 20 h (CTN) oder 4h (SH-SY5Y) mit den Testsubstanzen bzw. 1% DMSO inkubiert und anschließend wurden die sezernierten A β -Peptide mit dem A β 40 ECL Assay (SH-SY5Y-Zellen) oder dem A β Triplex Assay (CTN) in den Zellkulturüberständen gemessen. Die A β -Mengen wurden in % der Vehikelkontrolle (1% DMSO) angegeben. A) A β 40 Sekretion nach Behandlung mit 100 nM „Tripartite“ Substanz mit Inhibitor 1 (Nr. 4 in Tabelle 7). B) Der freie Inhibitor 1 wurde in Konzentrationen von 100 nM, 1 μM und 10 μM eingesetzt. C) „Tripartite“ Substanz mit Inhibitor 2 (Nr. 13 in Tabelle 7) bei einer Konzentration von 100 nM und 1 μM . D) Behandlung der Zellen mit dem freien Inhibitor 2 bei Konzentrationen von 100 nM, 1 μM und 10 μM . Statistische Signifikanz wurde durch 1-way ANOVA mit Dunnett's post test überprüft. ***: $p < 0,001$. Die MW \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind angegeben.

Für die Analyse aller Zellkulturüberstände aus behandelten CTN und aus den ersten Experimenten für SH-SY5Y Zellen, wurden ECL A β -Triplex Kits verwendet, die die simultane Messung der C-terminalen A β -Peptidvarianten A β 38, A β 40 und A β 42 erlauben. Wie in Abb. 21 für die CTN zu sehen ist, wurden bei einer getesteten Inhibitorkonzentration

von 100 nM alle drei A β -Peptide im gleichen Ausmaß durch die „Tripartite“ Substanzen inhibiert. In allen weiteren Experimenten wurde als Messgröße für die Wirksamkeit der getesteten Substanzen nur A β 40 gemessen, das den größten Anteil an der Gesamtmenge der A β -Peptide ausmacht.

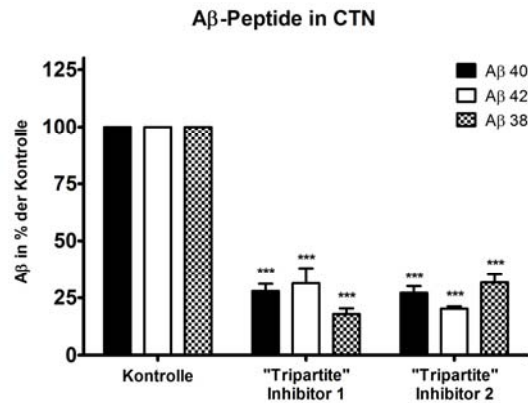


Abb. 21: „Tripartite“ Substanzen reduzieren die C-termianlen A β -Peptidvarianten in gleichem Ausmaß.

CTN wurden 20 h mit „Tripartite“ Substanzen mit Inhibitor 1 (100 nM) oder Inhibitor 2 (1 μ M) behandelt und die A β 40-Sekretion mit dem A β -Triplex ECL Assay analysiert, der simultan A β 40, A β 42 und A β 38 misst. Gezeigt sind jeweils MW \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in % der Vehikelkontrolle (1% DMSO). Statistische Signifikanz wurde durch 1-way ANOVA mit Dunnett's post test überprüft. ***: $p < 0,001$.

3.3.2.2 „Tripartite“ Substanzen reduzieren den β -Sekretase Schnitt

In Übereinstimmung mit dem postulierten Mechanismus einer Inhibierung der β -Sekretase, reduzierten „Tripartite“ Substanzen mit beiden Inhibitoren statistisch signifikant sAPP β , das lösliche APP-Spaltprodukt nach β -Sekretase Schnitt (Abb. 22A). Dies wurde begleitet durch einen Anstieg an sAPP α (Abb. 22A). Der hierfür benutzte ECL sAPP α/β Assay ist nicht kompatibel mit der schwedischen APP Mutation, weswegen die Messungen nur für CTN und SH-SY5Y APPwt durchgeführt wurden. Der Anstieg von sAPP α wurde zusätzlich für alle drei Zelltypen durch eine Western-Blot Analyse bestätigt (Abb. 22B). Das membranständige CTF β , das zweite direkte β -Sekretase-Spaltprodukt aus dem APP, wurde in den Zelllysaten untersucht. Wie in Abb. 22C für SH-SY5Y Zellen gezeigt, reduzierten die „Tripartite“ Substanzen CTF β , was ebenfalls für eine Inhibierung der β -Sekretase Spaltung durch die verwendeten „Tripartite“ Substanzen spricht.

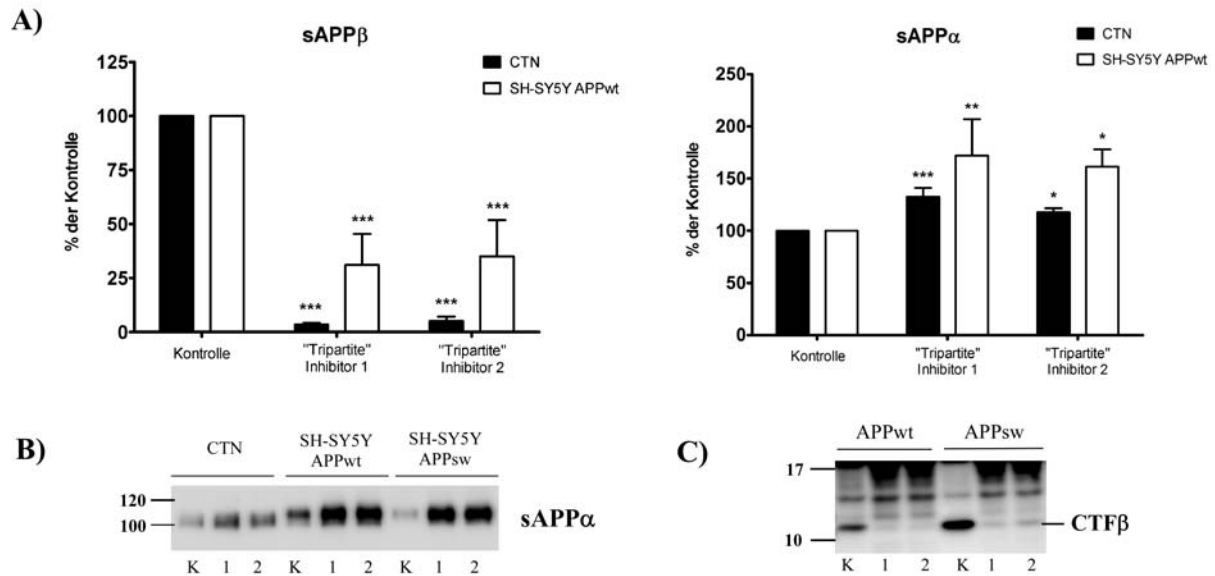


Abb. 22: „Tripartite“ Substanzen reduzieren den β -Sekretase Schnitt.

A) CTN und SH-SY5Y Zellen wurden 20 h bzw. 4 h mit 100 nM „Tripartite“ Substanzen inkubiert. In den Zellkulturüberständen wurde sAPP α und sAPP β mit dem sAPP α / β ECL Assay gemessen. Statistische Signifikanz wurde mit 1-way ANOVA und Tukey's post test bestimmt. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; $n = 3$. B) CTN und SH-SY5Y Zellen wurden 20 h mit 100 nM der „Tripartite“ Substanzen inkubiert. Die Proteine aus Zellkulturüberständen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und im Western-Blot wurde sAPP α mit dem 1E8 Antikörper nachgewiesen. C) Die Zelllysate aus dem in B) beschriebenen Versuch wurden in einem 4% - 12% Bis/Tris NuPAGE Gel aufgetrennt und nach Western-Blot mit dem 1E8 Antikörper angefärbt. K: Vehikelkontrolle; 1: „Tripartite“ Substanz mit Inhibitor 1 (Nr. 4); 2: „Tripartite“ Substanz mit Inhibitor 2 (Nr. 13). CTF β : C-terminales Fragment nach β -Sekretase Spaltung (~ 12 kDa). sAPP α bzw. sAPP β = lösliches N-terminales APP-Fragment nach α - bzw. β -Spaltung.

3.3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung mit „Tripartite“ Substanzen

Um toxische Effekte der „Tripartite“ Substanzen als möglichen Grund für die erniedrigte A β -Peptid Sekretion auszuschließen, wurden zwei verschiedene Zellviabilitätstests angewendet. Der MTT-Test spiegelt die mitochondriale Funktionalität wider, der LDH-Test die Membranintegrität. CTN wurden für 20 h mit den „Tripartite“ Substanzen 4 und 13 in einer Konzentrationsreihe behandelt. In Abb. 23 sind die Mittelwerte der mit den beiden Tests gemessenen Absorptionswerte in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen in % der Kontrollen angegeben. Eine Änderung der Absorption (Erniedrigung bei dem MTT-Test bzw. Erhöhung bei dem LDH-Test) zeigte eine verminderte Zellviabilität an. Statistisch signifikante Unterschiede in den Absorptionswerten zwischen den behandelten Zellen und der Kontrolle waren für die „Tripartite“ Substanz 4 (Inhibitor 1) ab einer Konzentration von 10 μ M sichtbar. Bei der „Tripartite“ Substanz 13 (Inhibitor 2) gab es bei dem MTT-Test keine

statistisch signifikanten Änderungen in dem gemessenen Konzentrationsbereich, bei dem LDH-Test zeichnete sich eine beginnende Toxizität bei einer Konzentration von 100 μM ab.

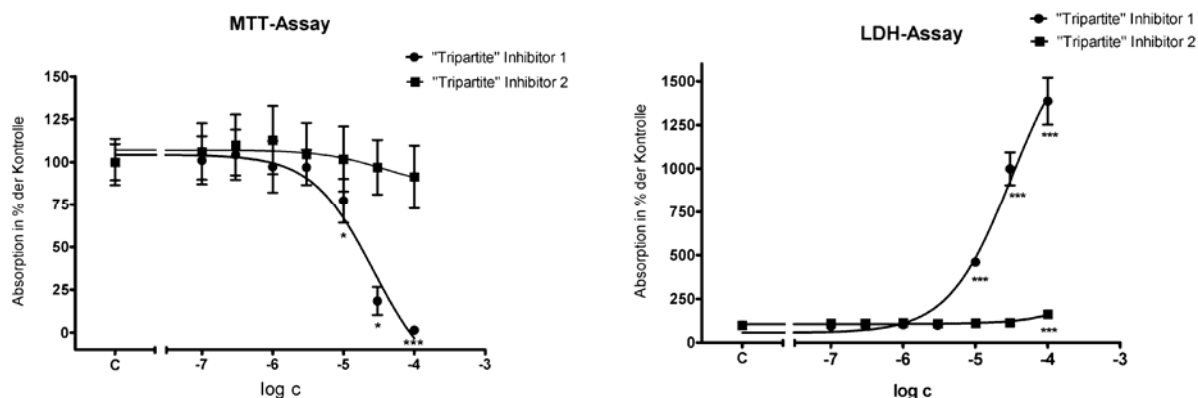


Abb. 23: MTT- und LDH-Zellviabilitätstests mit „Tripartite“ Substanzen.

CTN wurden für 20 h mit „Tripartite“ Substanzen 4 und 13 (s. Tabelle 7) in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 nM und 100 μM behandelt. Als „Vehikelkontrolle“ wurden die Zellen mit 1% DMSO behandelt. Im MTT-Test wird eine Toxizität durch eine verminderte Absorption bei 550 nm, im LDH-Test durch eine erhöhte Absorption bei 490 nm angezeigt. Die Messwerte wurden als % der Kontrolle angegeben (MW \pm SD, n = 6 (technische Wiederholung)). Die Absorptionswerte jeder gemessenen Konzentration wurden mit dem Kontrollwert verglichen und durch den 1-way ANOVA, gefolgt vom Dunnett's post test statistisch ausgewertet. *: p < 0,05; ***: p < 0,001. MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid; LDH = Lactatdehydrogenase.

3.3.3 Variationen der „Tripartite“ Strukturen: Einfluss von Lipidanker und Linkerlänge auf die A β -Sekretion

Es wurden verschiedene „Tripartite“ Substanzen mit dem Inhibitor 1 als Pharmakophor synthetisiert (Tabelle 7), bei denen entweder der Linker oder der Anker variiert wurde. So sollte der Einfluss dieser Module auf die Effektivität der Inhibition der A β -Peptid Sekretion untersucht werden und ein „optimaler Inhibitor“ im Hinblick auf Lipidanker und Linkerlänge bestimmt werden.

3.3.3.1 Bestimmung der optimalen Linkerlänge

Um die optimale Position des Inhibitors relativ zu der Membran zu bestimmen, wurden „Tripartite“ Substanzen mit Inhibitor 1, einem Dihydrocholesterol-Anker und variablen Linkerlängen zwischen 0 und 123 Å (Nr. 1 - 8 in Tabelle 7) in den drei Zellmodellen getestet. Es wurden zunächst alle Substanzen bei einer Konzentration von 100 nM eingesetzt, um erste Einblicke über mögliche geeignete Linkerlängen zu bekommen. Mit Linkerlängen, die zwischen 35 Å und 89 Å lagen, konnte eine Inhibition von ca. 75% für CTN und SH-SY5Y APPwt Zellen bzw. von ca. 90% für SH-SY5Y APPsw Zellen erreicht werden (Abb. 24).

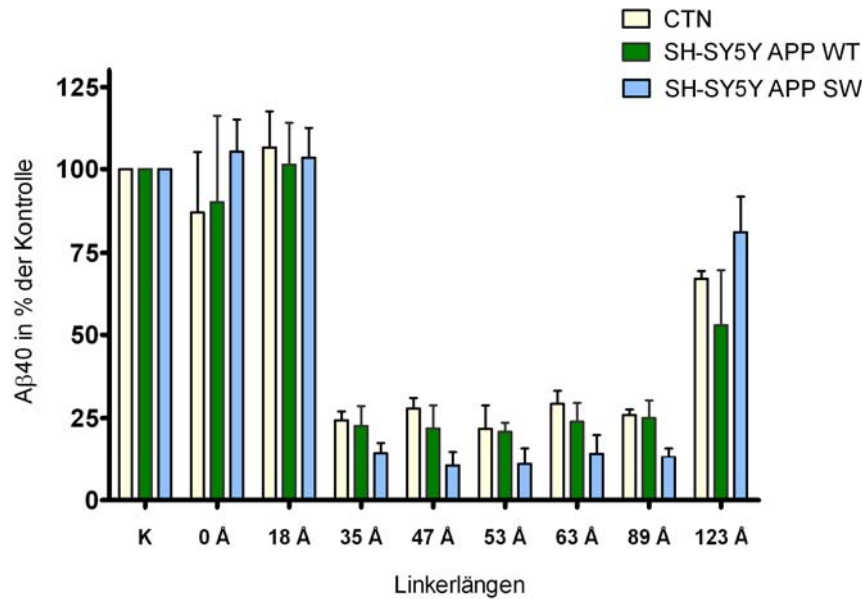


Abb. 24: Einfluss der Linkerlängen auf die Inhibition der A β 40 Sekretion durch „Tripartite“ Substanzen.

CTN wurden 20 h, SH-SY5Y Zellen 4 h mit je 100 nM der Testsubstanzen behandelt. A β 40 wurde in den Zellkulturüberständen mit dem A β 40 ECL Assay (SH-SY5Y Zellen) oder dem A β Triplex ECL Assay gemessen und prozentual zur Vehikelkontrolle angegeben. Es sind MW \pm SD angegeben. Alle Substanzen wurden mindestens in drei unabhängigen Experimenten gemessen. K: Vehikelkontrolle (1% DMSO).

Die Substanz die keinen Linker enthielt (0 Å), sowie diejenige mit einem 18 Å Linker waren nicht aktiv. Die Substanz mit einem 123 Å Linker zeigte nur einen geringen Effekt. Von den Substanzen, die bei 100 nM eine Aktivität zeigten, wurden vier ausgewählt um die optimale Linkerlänge zu bestimmen. Substanzen mit Linkerlängen von 35 Å, 47 Å, 63 Å bzw. 89 Å (Nr. 3, 4, 6 und 7 in Tabelle 7) wurden in einer halb-logarithmischen Verdünnungsreihe in SH-SY5Y APPwt und SH-SY5Y APPsw Zellen getestet. In jedem Einzelexperiment wurden beide Zelltypen mit jeweils neun verschiedenen Konzentrationen der vier Substanzen und der Vehikelkontrolle behandelt. Um in den SH-SY5Y APPsw Zellen eine ausreichend gute Definition des unteren Plateaus zu erreichen, wurde der getestete Konzentrationsbereich im dritten Experiment verändert. Die Konzentration der sezernierten A β 40 Peptide wurde in Duplikaten mit dem ECL A β 40 Assay gemessen und auf die Vehikelkontrolle normalisiert. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wurden gepoolt um Dosis-Wirkungskurven und EC₅₀ Werte durch nicht-lineare Regression zu berechnen (Abb. 25). Die Nullhypothese („alle hier berechneten logEC₅₀ Werte sind gleich“) wurde mit dem „Extra sum-of-squares F test“ überprüft und konnte ausgeschlossen werden ($p < 0,001$ für APPwt und $p < 0,01$ für APPsw). Die Kennzahlen der Dosis-Wirkungskurven sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

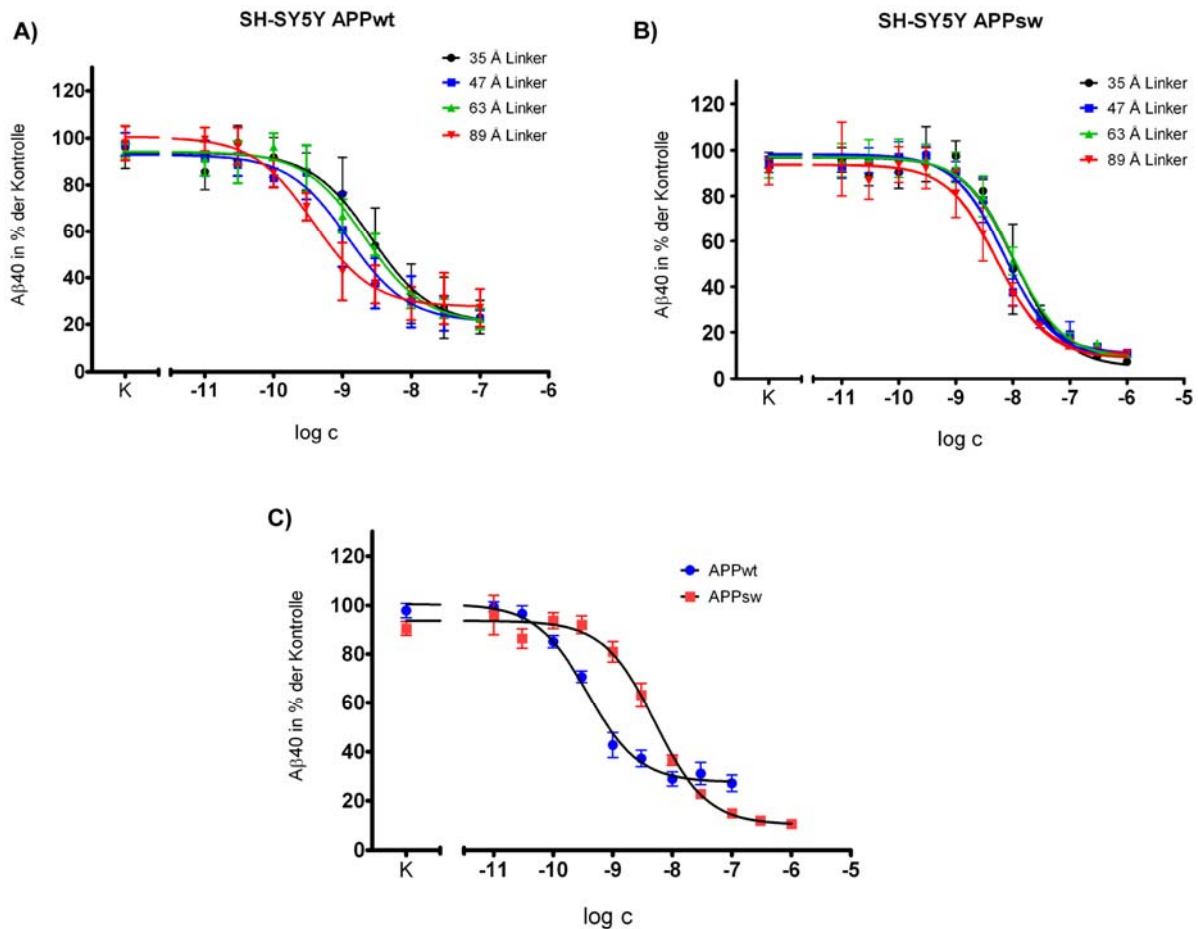


Abb. 25: Dosis-Wirkungskurven für „Tripartite“ Substanzen mit Linkerlängen von 35 Å, 47 Å, 63 Å bzw. 89 Å.

A) Die Testsubstanzen wurden in halb-logarithmischen Schritten in Konzentrationen zwischen 10 pM und 100 nM in SH-SY5Y APPwt Zellen getestet. Die Werte wurden normalisiert und aus drei unabhängigen Experimenten „gepoolt“. B) In SH-SY5Y APPsw Zellen wurden die Substanzen in drei voneinander unabhängigen Experimenten in zwei Konzentrationsbereichen getestet (10 pM – 100 nM und 100 pM – 1 µM), um eine bessere Definition des unteren Plateaus der Kurve zu erreichen. Die Messwerte der drei Experimente wurden ebenfalls normalisiert und gepoolt. C) Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der Substanz mit einem 89 Å Linker (Substanz 7) für SH-SY5Y APPwt und APPsw. C: Vehikelkontrolle (1% DMSO). MW ± SD sind angegeben.

In beiden Zelltypen wurde der niedrigste EC_{50} Wert, also die höchste Potenz, mit der Substanz mit einem 89 Å Linker beobachtet. Die Reihenfolge der potenten Substanzen war jedoch bezüglich der Linkerlänge nicht linear. Die Substanz mit einem 47 Å Linker hatte den zweitniedrigsten EC_{50} Wert, während die Substanzen mit einem 35 Å und einem 63 Å Linker, die eine annähernd gleiche Potenz aufwiesen, weniger effizient waren. Diese Beobachtung konnte in jedem der drei einzelnen Experimente, wie auch in der Auswertung aus den gepoolten Daten gemacht werden. Die EC_{50} Werte von allen vier getesteten Substanzen waren in Zellen die APPwt exprimieren niedriger als in APPsw Zellen. So betrug z.B. der EC_{50} für die Substanz mit einer Linkerlänge von 89 Å bei SH-SY5Y APPwt Zellen ca. 0,4 nM und bei

SH-SY5Y APPsw Zellen ca. 5 nM (Tabelle 8). Weder in SH-SY5Y APPwt Zellen, noch in SH-SY5Y APPsw Zellen konnten die „Tripartite“ Substanzen unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen die A β -Peptid Sekretion komplett reduzieren. Das untere Plateau lag für SH-SY5Y APPwt Zellen bei ca. 22% der Kontrolle und für SH-SY5Y APPsw Zellen bei ca. 9% der Kontrolle (Abb. 25 und Tabelle 8). Nach einer längeren Inkubationszeit der Substanzen von 20 h mit einer Konzentration der Testsubstanzen von 1 μ M, konnten noch ca. 20% A β 40 im Vergleich zur Kontrolle in SH-SY5Y APPwt Zellen und ca. 7% in SH-SY5Y APPsw Zellen gemessen werden. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass diese restlichen A β -Peptide die Fraktion widerspiegeln, die in der Zeit sezerniert wurde, bevor die Inhibitoren an ihren Wirkort gelangten. Die unterschiedliche Wirksamkeit der „Tripartite“ Substanz 7 auf die A β -Generierung aus APPwt und aus APPsw ist in Abb. 26C dargestellt, in der die beiden Dosis-Wirkungskurven für SH-SY5Y APPwt bzw. APPsw in einem Graphen abgebildet sind.

Tabelle 8: Kennzahlen der Dosis-Wirkungskurven mit „Tripartite“ Substanzen in SH-SY5Y Zellen. *

Linkerlänge [Å]	SH-SY5Y APPwt			SH-SY5Y APPsw		
	EC ₅₀ [#] [nM]	95% Konfidenz- intervall EC ₅₀ [nM]	unteres Plateau [%]	EC ₅₀ [nM]	95% Konfidenz- intervall EC ₅₀ [nM]	unteres Plateau [%]
35	2,63	1,62 – 4,29	20,32	10,90	7,76 – 15,30	5,24
47	1,21	0,89 – 1,81	21,16	6,80	5,25 – 8,82	10,64
63	2,11	1,58 – 2,81	20,54	10,01	7,89 – 12,7	8,93
89	0,37	0,27 – 0,52	27,58	5,09	3,73 – 6,94	10,42

* Die Werte entstammen den in Abb. 25 abgebildeten Dosis-Wirkungskurven. [#] EC₅₀ = mittlere effektive Konzentration der verwendeten „Tripartite“ Substanzen.

3.3.3.2 Einfluss des Lipid-Ankers auf die Effektivität der „Tripartite“ Substanzen

„Tripartite“ Substanzen mit verschiedenen Lipid-Ankern wurden auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Reduktion der A β -Peptid Sekretion geprüft. Dazu wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Knölker an der Technischen Universität Dresden Substanzen synthetisiert, die den Inhibitor 1, einen Linker von 89 Å und einen Dihydrocholesterol-, Palmityl-, Myristyl- oder Oleyl-Anker enthielten. Die Strukturen der eingesetzten Lipid-Anker sind in Abb. 26 dargestellt. Die „Tripartite“ Substanzen mit den genannten unterschiedlichen Ankern, sowie eine Substanz, die nur den Inhibitor und einen Linker, aber keinen Anker enthielt, wurden in CTN sowie in SH-SY5Y APPwt Zellen und SH-SY5Y APPsw Zellen bei einer Konzentration von jeweils 100 nM getestet.

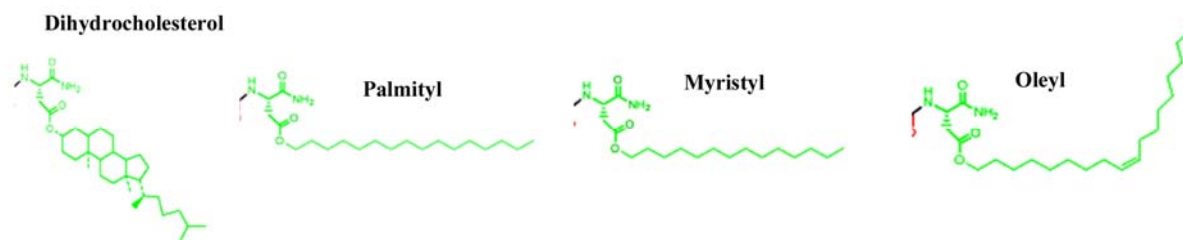


Abb. 26: Strukturen von Lipid-Ankern, die in dieser Arbeit für die „Tripartite“ Substanzen eingesetzt wurden.

Die Lipide wurden mit einem Aspartat verestert, über das die Kopplung an den Linker erfolgte.

In allen drei Zellkulturmodellen zeigte die Substanz mit dem Dihydrocholesterol-Anker die stärkste Wirkung, gefolgt von der mit einem Palmityl-Anker (Abb. 27A). Die Erhöhung der Konzentrationen der „Tripartite“ Substanzen mit Palmityl- oder Myristyl-Anker auf 1 μ M zeigten eine dosisabhängige Reduktion der A β -Sekretion. Die „Tripartite“ Substanz mit einem Oleyl-Anker, einer ungesättigten Kohlenstoffkette, ebenso wie die Substanz ohne Anker, zeigten bei den verwendeten Konzentration in keinem der Zellmodelle einen Effekt. Diese Dosis-Abhängigkeit ist in Abb. 27B für den Vergleich von Cholesterol- und Palmityl-Anker in SH-SY5Y APPwt Zellen gezeigt.

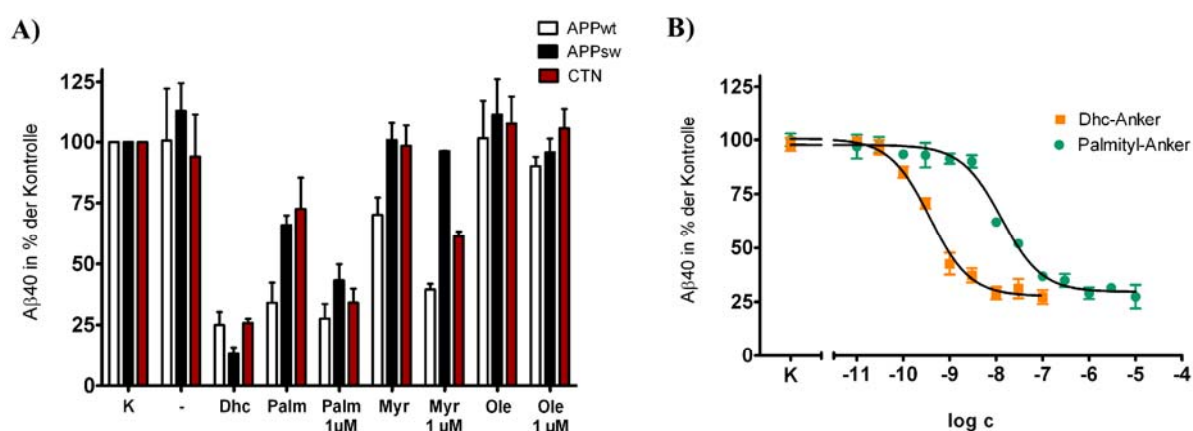


Abb. 27: Einfluss der Lipid-Anker auf die Inhibition der A β 40 Sekretion durch „Tripartite“ Substanzen.

A) CTN wurden 20 h, SH-SY5Y Zellen 4 h mit Testsubstanzen behandelt, A β 40 in den Zellkulturüberständen mit A β ECL Assays gemessen und relativ zur Kontrolle angegeben. K: Vehikelkontrolle (1% DMSO); MW \pm SD sind angegeben, aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. -: kein Anker (Nr. 9); Dhc: Dihydrocholesterol-Anker (Nr. 7); Palm: Palmityl-Anker (Nr. 10); Myr: Myristyl-Anker (Nr. 11); Ole: Oleyl-Anker (Nr. 12). Wenn nicht anders angegeben wurden 100 nM der Substanzen eingesetzt. B) Dosis-Wirkungskurven in SH-SY5Y APPwt Zellen. Die Testsubstanzen wurden in halblogarithmischen Konzentrationsreihen zwischen 10 pM und 100 nM (Cholesterol-Anker; orange) bzw. 10 pM und 10 μ M (Palmityl-Anker; grün) zu den Zellen gegeben. Die Werte wurden auf die Vehikelkontrolle normalisiert, aus drei unabhängigen Experimenten gepoolt und mit der GraphPad 5.01 Software ausgewertet. Cholesterol-Anker: EC₅₀ = 0,37 nM; unteres Plateau = 27,6 %. Palmityl-Anker: EC₅₀ = 13,0 nM; unteres Plateau = 29,6%.

Der berechnete EC_{50} war für die Substanz mit dem Palmityl-Anker in etwa 35fach höher als für die Substanz mit dem Dihydrocholesterol-Anker. Bei den SH-SY5Y Zellen, die APP_{sw} exprimieren, wirkte sich die Substitution des Ankers noch stärker aus. Der EC_{50} für die Substanz mit dem Palmityl-Anker war in etwa 70fach höher als für die Substanz mit einem Dihydrocholesterol-Anker. Wie oben bereits beschrieben (s. 3.3.3.1) wurde mit keiner der getesteten Substanzen unter den experimentellen Bedingungen eine vollständige Inhibition der A β -Peptid Sekretion erreicht.

3.3.4 Vergleich der A β -Peptidmuster vor und nach Behandlung mit „Tripartite“ β -Sekretaseinhibitoren

Um zu untersuchen, ob verschiedene N- und C-terminale A β -Peptidevarianten in gleichem Maße durch die Behandlung mit den „Tripartite“ BACE Inhibitoren beeinflusst werden, wurden A β -Peptide aus Zellkulturüberständen von CTN mittels Harnstoff SDS-PAGE/Westernblot untersucht. Wie in Abb. 28 dargestellt, war nur in den Kontrollproben ein Muster an fünf A β -Peptiden sichtbar (A β (1-37), -(1-38), -(1-39), -(1-40) und -(1-42); Zuordnung der Peptide siehe auch 3.1.1 und 3.1.5). Nach der Behandlung mit 100 nM der „Tripartite“ Substanz Nr. 6 waren diese A β -Peptide deutlich reduziert, während eine weitere Peptidbande oberhalb der A β (1-42) Bande nicht durch die Behandlung verändert zu sein schien.

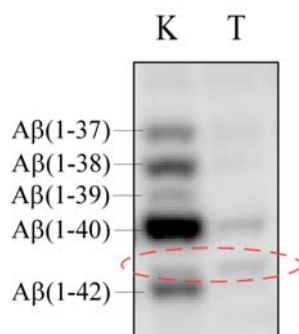


Abb. 28: Effekt der „Tripartite“ Substanzen auf das A β -Peptidmuster aus CTN.

CTN wurden 20 h mit 1 μ M der „Tripartite“ Substanz Nr. 6 (T) bzw. der Vehikelkontrolle (K) inkubiert. A β -Peptide aus den Zellkulturüberständen wurden mit dem 1E8 Antikörper immunpräzipitiert und mit Harnstoff SDS-PAGE gefolgt von Western-Blot mit dem 1E8 Antikörper analysiert. Ein Peptid, dessen Konzentration durch die „Tripartite Substanz“ anscheinend nicht reduziert wurde, ist rot eingekreist.

3.3.4.1 Optimierung der Auftrennung N-terminal verkürzter A β -Peptide

Vorversuche hatten angedeutet, dass es sich bei der in Abb. 28 gekennzeichneten Bande um das N-terminal verkürzte A β (2-40) handeln könnte. In dem gezeigten Blot lief diese Bande direkt oberhalb der A β (1-42) Bande. Abhängig von geringen Abweichungen von Laufzeit des Gels und Trenngellänge, war eine eindeutige Abgrenzung dieser vermeintlichen A β (2-40) Bande von A β (1-42) schwer bis gar nicht zu verwirklichen. Aus diesem Grunde wurde die Trenngelmatrix optimiert um eine verbesserte Auftrennung N-terminal verkürzter A β -Peptide zu erreichen. Nach der Veränderung mehrerer Variablen der Trenngelzusammensetzung zeigte sich, dass die Konzentration der Schwefelsäure im Trenngelpuffer den größten Einfluss auf die Auftrennung der N-terminal verkürzten A β -Peptide hatte. Eine optimale Auftrennung zwischen A β (1-40), A β (2-40) und A β (1-42) wurde durch eine Reduktion der Schwefelsäurekonzentration im Trenngelpuffer von 0,4 M auf 0,3 M erreicht. In Abb. 29 ist ein Vergleich der Trennung mehrerer synthetischer A β 40- und A β 42-Peptide mit dem Standard-Protokoll und der veränderten Variante zu sehen. Durch Modifikation des Trenngelpuffers zeigten die A β -Peptide eine geringere elektrophoretische Mobilität. A β (1-40) lief unter diesen Bedingungen auf Höhe eines Markerproteins von 15 kDa und der Abstand zwischen den verschiedenen A β -Peptiden war deutlich erweitert, was eine verbesserte Trennung ermöglichte (Abb. 29B).

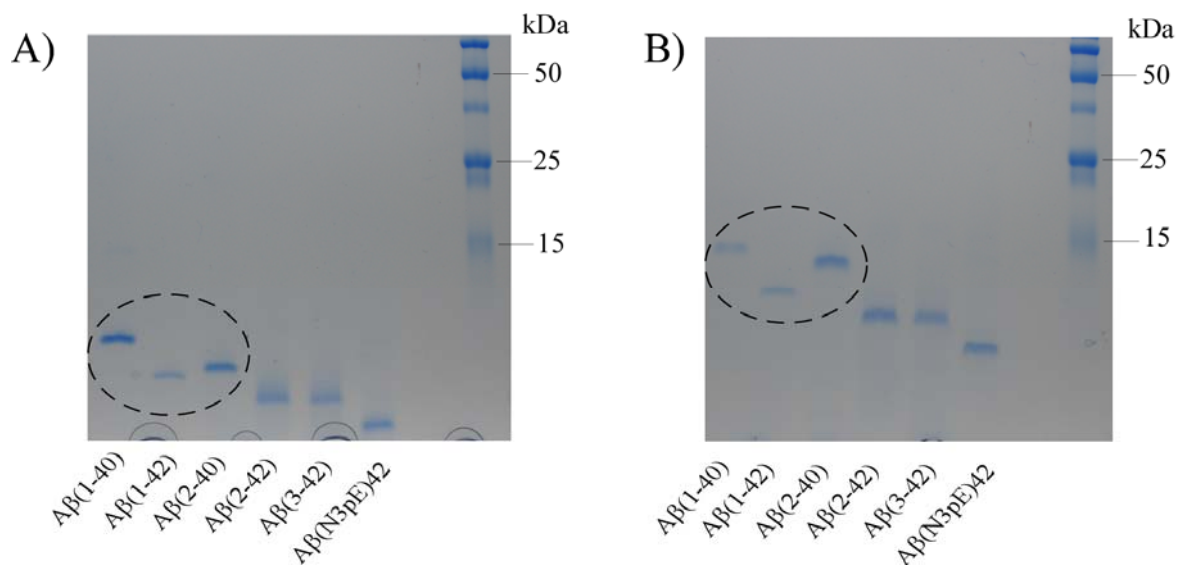


Abb. 29: Optimierung der Trenngelmatrix zur verbesserten Auftrennung N-terminal verkürzter A β -Peptide.

A) Verschiedene synthetische A β -Peptide (je 500 ng) wurden durch Harnstoff SDS-PAGE nach dem Standardprotokoll aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. B) A β -Peptide wurden wie in A) beschrieben aufgetrennt und gefärbt. Der Trenngelpuffer wurde jedoch modifiziert, indem die Konzentration der Schwefelsäure von 0,4 M auf 0,3 M reduziert wurde. A β (1-40), A β (2-40) und A β (1-42), für die eine verbesserte Auftrennung erreicht werden sollte, sind in eingekreist.

3.3.4.2 A β -Peptid-Muster in APPwt versus APPsw exprimierenden Zellen

Die für die Auftrennung von N- und C-terminalen Varianten optimierte SDS-PAGE-Methode wurde im Folgenden eingesetzt, um die verschiedenen A β -Peptidvarianten zu vergleichen, die von den SH-SY5Y APPwt und den SH-SY5Ysw Zellen ins Medium sezerniert wurden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob, wie in den CTN beobachtet (s. 3.3.4.1), ebenfalls einzelne A β -Peptidvarianten beobachtet werden könnten, die nach BACE Inhibition nicht verringert werden. Hierzu wurden die SH-SY5Y Zellen 20 h mit je 100 nM der freien Inhibitoren 1 und 2 oder verschiedenen „Tripartite“ Substanzen behandelt. Die A β -Peptide wurden durch Immunpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand angereichert und durch Harnstoff SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Für die Immunpräzipitation als auch für den Western-Blot wurde der 6E10 Antikörper angewendet. In Abb. 30A ist zu sehen, dass sowohl die SH-SY5Y APPwt als auch die SH-SY5Y APPsw Zellen die Peptide A β (1-42), -(1-40), -(1-39), -(1-38) und -(1-37) sezernierten. Die Mengen dieser C-terminalen A β -Peptidvarianten wurden alle durch die „Tripartite“ Substanzen reduziert. In den Zellkulturüberständen von Zellen, die APPwt exprimieren, konnte zusätzlich eine Bande identifiziert werden, die sich in dem Gel auf gleicher Höhe wie A β (2-40) befand. Die Menge dieses Peptides wurde durch die „Tripartite“ Substanzen nicht reduziert, sie schien sich sogar leicht zu erhöhen (Abb. 30). Dies galt für Substanzen mit beiden in dieser Arbeit untersuchten Pharmakophoren, als auch für die Substanzen mit Inhibitor 1 und unterschiedlichen Linkern bzw. unterschiedlichen Ankern (für die Substanzen Nr. 6, 7 und 13 ist dies in Abb. 30A zu sehen). Diese Beobachtung ist vergleichbar mit der in unter 3.3.4.1 in Abb. 28 gezeigten für CTN. In den SH-SY5Y APPsw Zellen hingegen konnte eine korrespondierende A β -Bande nicht nachgewiesen werden (Abb. 30A). Die aus den Zellkulturüberständen immunpräzipitierten A β -Peptide wurden weiterhin durch 2DE aufgetrennt, um die beobachteten A β -Peptidvarianten weiter zu charakterisieren. Wie in Abschnitt 3.1.3.2 beschrieben weisen A β -Peptide denen die erste Aminosäure fehlt einen basischeren pI auf als A β -Peptide die mit Aspartat in Position 1 beginnen. In den Kontroll-Zellkulturüberständen aus SH-SY5Y APPwt und SH-SY5Y APPsw waren hauptsächlich A β -Peptide mit einem pI von ca. 5,4 nachweisbar, die somit an der Position 1 des A β -Peptides begannen (Abb. 30B). Nach Behandlung der Zellen mit der „Tripartite“ Substanz Nr. 7 waren jedoch kaum noch Peptide mit einem pI von ca. 5,4 in dem Zellkulturüberstand zu finden. Die unter diesen Bedingungen weiterhin von SH-SY5Y APPwt Zellen sezernierten A β -Peptide wiesen basischere pIs von ca. 5,7 und 6,3 auf. Letzterer wird für A β -Peptide, die an Position 2 oder 3 beginnen erwartet

(Protein Calculator 3.3). In den Zellkulturüberständen der SH-SY5Y APPsw Zellen hingegen wurden diese Peptidvarianten nicht beobachtet (Abb. 30B).

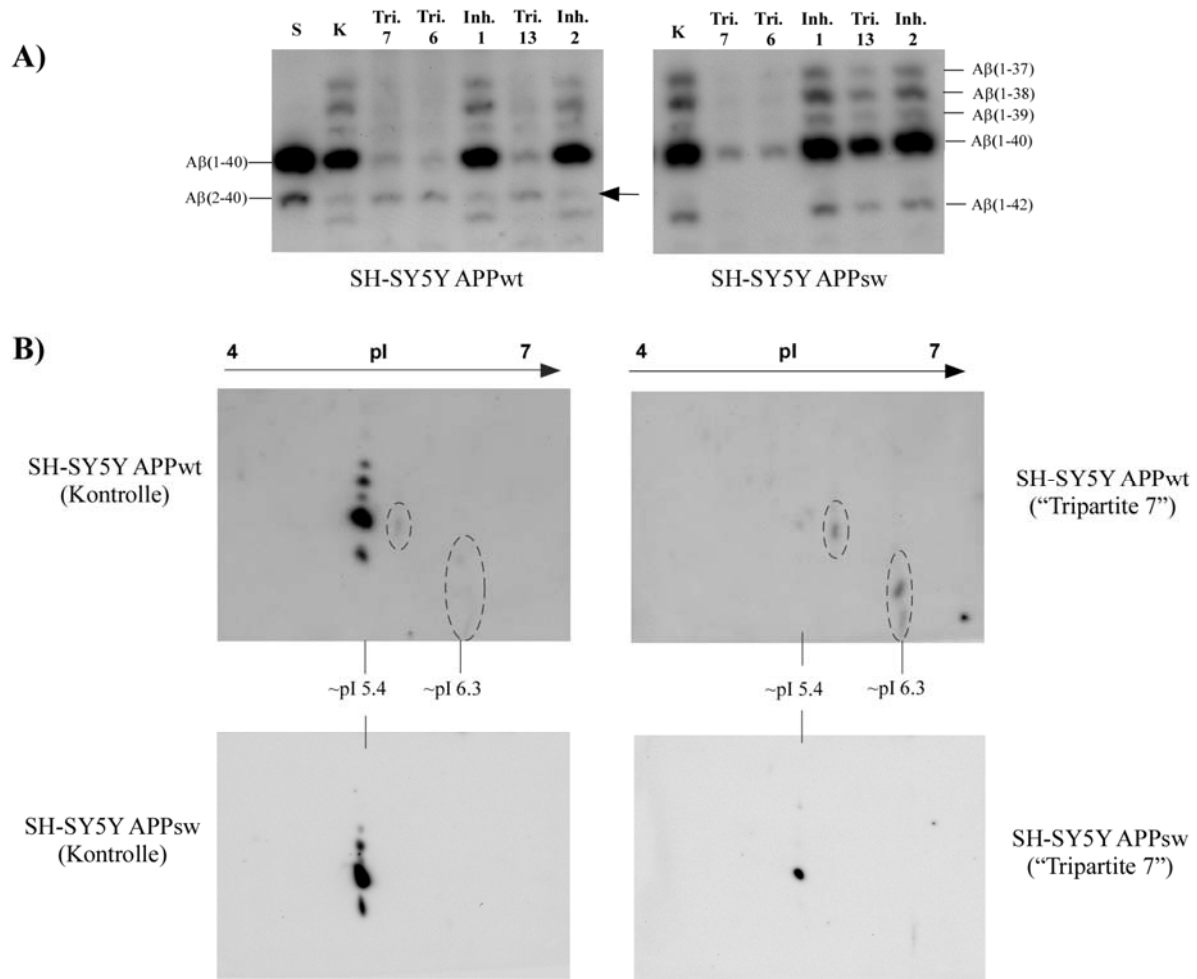


Abb. 30: „Tripartite“ Substanzen haben differentielle Effekte auf die Aβ-Peptid Sekretion von APPwt oder APPsw exprimierenden Zellen.

Die Zellen wurden 20 h mit 100 nM der Testsubstanzen bzw. der Vehikelkontrolle (1% DMSO) inkubiert. Aβ-Peptide aus den Zellkulturüberständen wurden mit dem 6E10 Antikörper immunpräzipitiert. A) Die Aβ-Peptide wurden durch Harnstoff SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit dem 6E10 Antikörper analysiert. Für das Trenngel wurde ein Trenngelpuffer mit 0,3 M Schwefelsäure benutzt. 250 pg synthetisches Aβ(1-40) und 50 pg synthetisches Aβ(2-40) wurden zum Vergleich auf das Gel aufgetragen. S: Synthetische Aβ-Peptide; K: Vehikel-Kontrolle (1% DMSO). Der Pfeil deutet auf die Bande aus SH-SY5Y APPwt Zellen, die mit Aβ(2-40) komigrierte. B) Immunpräzipitierte Aβ-Peptide von SH-SY5Y APPwt bzw. APPsw Zellen (Behandlung mit „Tripartite“ Substanz oder Vehikel-Kontrolle) wurden durch 2DE (linearer pH-Gradient 4-7) aufgetrennt und im Western-Blot mit dem Antikörper 6E10 detektiert. Die pH-Werte 5,4 und 6,3 sind markiert. In den Überständen aus SH-SY5Y APPwt Zellen sind die Spots eingekreist, die von einem pI bei 5,4 abwichen.

Inh. 1 = freier Inhibitor 1; Inh. 2 = freier Inhibitor 2; Tri = „Tripartite“ Substanz. Nummerierungen der „Tripartite“ Substanzen laut Tabelle 7.

4 Diskussion

Die vorherrschende Hypothese zu der Pathogenese der AD ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die der Akkumulation von A β -Peptiden in bestimmten Hirnregionen eine zentrale ursächliche Rolle im Krankheitsprozess zuschreibt (Hardy und Selkoe, 2002). Folglich wird A β als ein Zielmolekül für potentielle Therapiemöglichkeiten angesehen. Als Zielsetzung gelten die Verminderung oder Modulation der A β -Peptid Bildung, die Inhibition der A β -Aggregation und eine verstärkte Beseitigung von A β z.B. durch Immuntherapie (Citron, 2010; Klafki et al., 2006).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung der A β -Amyloidablagerungen in einem transgenen Mausmodell mit der in humanen Gehirnen mit proteinchemischen Methoden verglichen. Besonderes Augenmerk galt hier der Analyse von N-terminal modifizierten Formen des A β -Peptides. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die biologische Aktivität von neuartigen „Tripartite“-Inhibitoren in Zellkulturen untersucht.

4.1 Akkumulation von A β -Peptiden in einem Mausmodell und Vergleich zu der Pathologie beim Menschen

Transgene Mäuse, die mutiertes humanes APP überexprimieren sind ein weit verbreitetes Modell für die Evaluation potentieller Krankheitsmechanismen der AD und für die präklinische Untersuchung von Wirkstoffkandidaten. Da diese Modelle aber in der Regel nur bestimmte Aspekte der Pathologie abdecken, ist eine genaue Beurteilung, inwieweit das Modell den Krankheitsprozess bzw. spezifische Aspekte daraus widerspiegelt, notwendig.

In dieser Arbeit wurde die Amyloidpathologie von APP23 Mäusen, vor und nach dem Einsetzen der altersabhängigen und progressiv verlaufenden Amyloidakkumulation, biochemisch hinsichtlich der abgelagerten Varianten an A β -Peptiden untersucht und mit humanen Autopsieproben von AD-Patienten und entsprechenden Kontrollen verglichen. In den Gehirnen der APP23 Mäuse war eine massive Akkumulation der A β -Peptide zwischen einem Alter von 3 und 24 Monaten beobachtbar, die sowohl eine detergentlösliche, als auch eine erst in Ameisensäure lösliche Fraktion betraf. Im Vergleich zu 3 Monate alten Mäusen war die Gesamtmenge an A β -Peptiden in der Detergenz-Fraktion in 24 Monate alten Mäusen etwa 1000fach erhöht. Stärker aggregierte und damit schlechter löslichere A β -Peptide wurden mit 70% Ameisensäure extrahiert und konnten in den Mäusen ab einem Alter von 7 Monaten nachgewiesen werden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit publizierten histologischen Untersuchungen, nach denen in den Gehirnen der APP23 Mäuse ab einem Alter von 6

Monaten vereinzelte A β -Plaques nachgewiesen werden konnten (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Der Zeitverlauf der A β -Akkumulation in den APP23 Mäusen deckt sich mit der „Keim-Theorie“ für die Aggregation von A β -Peptiden und dem Prion Protein (Harper und Lansbury, Jr., 1997; Jarrett und Lansbury, Jr., 1993). Demnach ist die Polymerisation von Monomeren abhängig von der Bildung eines oligomeren Keims, der nach der Überschreitung einer kritischen Konzentration und einer zeitlichen Verzögerung entsteht. Nach der Bildung des Keims erfolgt die Wachstumsphase, in der der Keim schnell durch Polymerisation wächst (Abb. 31).

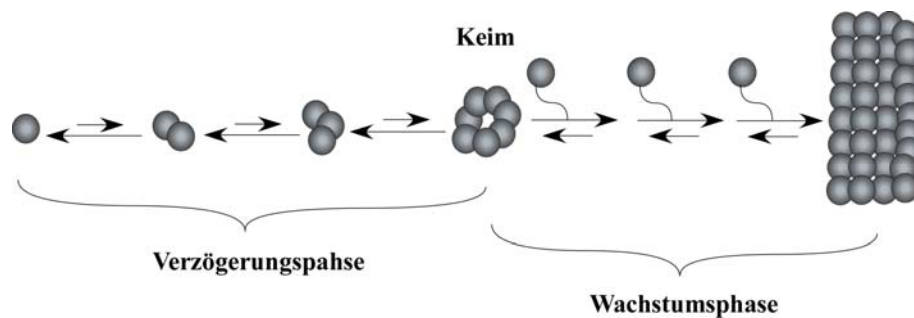


Abb. 31: Vereinfachte Darstellung der „Keim Theorie“ für die Aggregation von Amyloidfibrillen.

Während der Verzögerungsphase entstehen energetisch ungünstige Assoziationen und ein instabiler Keim. Nach Überschreitung der kritischen Konzentration entstehen ein stabiler Keim und eine Reihe von energetisch vorteilhaften Assoziationen, die in der Wachstumsphase zur Ausbildung der Fibrillen führen. Abbildung nach Harper und Lansbury, 1997.

Durch 1D- und 2D-Auftrennungen in Verbindung mit Western-Blots und massenspektrometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass sich in den Gehirnen der APP23 Mäuse regelhaft mehrere A β -Peptide mit verschiedenen N- und C-Termini ablagerten. A β (1-40) bildete jeweils die Hauptmenge, daneben wurden die Varianten A β (1-37), -(1-38), -(1-39), -(1-42) und geringe Mengen an N-terminal verkürztem A β (2-40) und -(3-40) gefunden. Die zunächst durch Western-Blot gemachten Zuordnungen der A β -Peptide aufgrund ihrer Laufgeschwindigkeiten in Harnstoff SDS-PAGE, konnten durch Massenspektrometrie für die Ameisensäure-Fraktion eindeutig bestätigt werden. Bei den Analysen der humanen Proben zeigte sich, dass eine der beiden untersuchten Gewebeproben aus nicht dementen Kontrollen, ähnlich große A β -Mengen wie die analysierten AD-Proben enthielt. Dies deckt sich mit der Literatur von Berichten über kognitiv gesunde ältere Menschen, die bei Autopsien Plauepathologie aufwiesen (Brayne et al., 2009; Pike et al., 2007; Savva et al., 2009; Schmitt et al., 2000).

Im Gegensatz zu den APP23 Proben enthielten die detergenzlöslichen Fraktionen der humanen Proben überwiegend A β -Peptide, die aufgrund ihrer elektrophoretischen Eigenschaften als A β (1-42) und A β (2/3-42) eingeordnet wurden. Zusätzlich zu diesen A β 42

Peptiden, konnte in einigen der humanen Ameisensäure-Fractionen auch A β (1-40) nachgewiesen werden. Diese präferentielle Ablagerung von A β 42 in humanen Plaques ist in der Literatur beschrieben (Iwatsubo et al., 1994; Miller et al., 1993). Da A β 42 hydrophober ist und stärker zur Aggregation neigt als die C-terminal kürzeren Peptide, wird angenommen, dass es den Keim für die Plaques bildet (Jarrett et al., 1993). In den untersuchten amyloiden Ablagerungen der APP23 Mäuse wurde zu Beginn der Pathologie ein höherer Anteil an A β (1-42) beobachtet als in späteren Stadien (A β (1-42)/(1-40) in der Ameisensäure-Fraktion: 0,7 bei 7 Monate alten und 0,07 bei 24 Monate alten Mäusen), was ebenfalls auf eine stärkere Rolle bei der Initiierung der Amyloidakkumulation hinweisen könnte. Insgesamt fiel aber auf, dass im Vergleich zu den humanen Proben die relative Zusammensetzung der Amyloidpräparationen der APP23 Mäuse hinsichtlich der vorhandenen A β -Peptidvarianten deutlich anders war.

Ein in vielen Studien gut belegter Biomarker für die AD im Menschen ist eine selektiv verminderte Konzentration an löslichem A β 42 im CSF (Lewczuk et al., 2004b; Motter et al., 1995; Sunderland et al., 2003). Die Beobachtung, dass die A β 42 Konzentration im humanen CSF invers korreliert zu sein scheint mit Messungen zur Amyloidlast *in vivo* durch Positronenemissionstomografie-Messungen (Fagan et al., 2006; Grimmer et al., 2009), deutet daraufhin, dass die selektive Abnahme an A β 42 im Liquor vermutlich in direktem Zusammenhang mit einer präferentiellen Akkumulation dieses Peptides im Gehirn steht.

In den APP23 Mäusen konnten keine Hinweise auf zeitabhängige Veränderungen im A β -Peptid Muster im CSF gefunden werden. Sowohl die A β -Gesamtmenge als auch die relativen Verhältnisse der nachgewiesenen C-terminalen Varianten blieben in den verschiedenen Altersgruppen stabil. Das A β (1-42)/(1-40) Verhältnis im Liquor der Mäuse entsprach dem Wert von humanen nicht dementen Kontrollen (Bibl et al., 2006). Der Befund, dass in den Mäusen keine starke präferentielle Ablagerung von A β 42 statt fand und alle fünf C-terminalen Varianten in ähnlichen relativen Mengen zueinander abgelagert wurden, wie sie auch im Liquor vorkamen, ist im Einklang mit dieser Beobachtung.

4.2 Modifizierte A β -Peptide in humanen und APP23 amyloiden Plaques

Die A β -Peptide aus humanen Amyloidablagerungen besitzen eine starke Heterogenität an ihrem N-Terminus. Verschiedene N-terminal trunkierte A β -Peptidvarianten, wie z.B. A β (2-x), -(3-x), -(4-x) und -(5-x) wurden bereits in humanen amyloiden Plaques durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Güntert et al., 2006; Miller et al., 1993; Roher et al., 1993; Sergeant et al., 2003). Auch die in dieser Arbeit untersuchten humanen Proben

enthielten große Anteile N-terminal trunkierter A β -Peptide, wie 1D- und 2D-Blots mit dem 6E10 Antikörper, der verschiedene N-terminale A β -Peptidvarianten erkennt, zeigten. In den Amyloidpräparationen aus den APP23 Mäusen konnten durch 2DE und Massenspektrometrie in geringen Mengen die N-terminal verkürzten Peptide A β (2-40) und A β (3-40) nachgewiesen werden. In bisherigen publizierten massenspektrometrischen Analysen zu A β -Peptiden aus APP transgenen Mäusen, darunter auch APP23 Mäuse, wurden keine N-terminal trunkierte Formen beschrieben (Kalback et al., 2002; Kuo et al., 2001), was möglicherweise mit der Nachweisempfindlichkeit oder der Probenaufarbeitung erklärt werden kann.

A β das an Position 3 beginnt und zu einem Pyroglutamat zyklisiert ist (A β (N3pE); Entstehung siehe Abb. 32), ist die häufigste N-terminale Modifikation in humanen Plaques. In Übereinstimmung mit der Literatur (Kuo et al., 1997; Saido et al., 1995) enthielten die hier im Western-Blot mit einem gegen A β (N3pE) gerichteten Antiserum untersuchten humanen Proben große Mengen dieses Peptides. Der relative Anteil in Detergenz- und Ameisensäure-Fraktion wurde auf 20% - 60% der A β -Gesamtmenge geschätzt. Die APP23 Mäuse hingegen enthielten nur sehr geringe Mengen an A β (N3pE), die aufgrund von semiquantitativen Western-Blot Auswertungen auf ca. 0,1% der Gesamtmenge geschätzt wurden. Für einen Nachweis durch Massenspektrometrie waren diese Mengen nicht ausreichend. In publizierten biochemischen Analysen von Amyloid aus APP transgenen Mäusen wurde diese A β -Peptidvariante nicht identifiziert (Kalback et al., 2002; Kuo et al., 2001), was vermutlich mit der Sensitivität der verwendeten Methoden zu erklären ist. In neueren Untersuchungen, in einem anderen transgenen Mausmodell der AD, konnte A β (N3pE) durch immunhistologische Färbungen in den amyloiden Plaques dieser Mäuse nachgewiesen werden (Wirths et al., 2010).

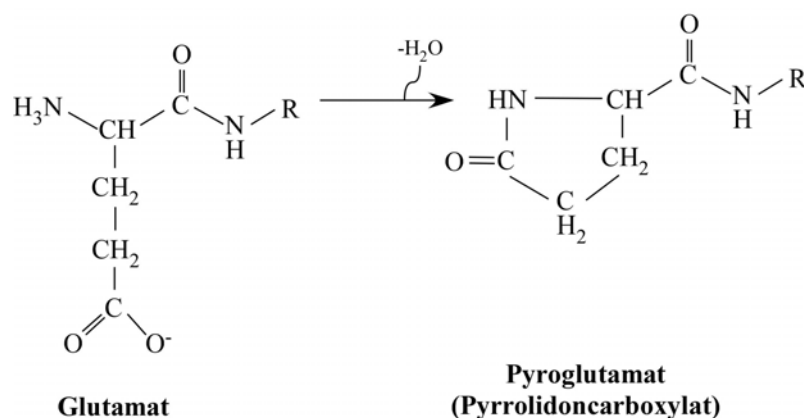


Abb. 32: Entstehung des Pyroglutamats aus dem Glutamat.

Die γ -Carboxygruppe des N-terminalen Glutamatrestes eines Peptides kann unter Wasserabspaltung zu dem Pyroglutamat (alternativer Name: Pyrrolidoncarboxylat) zyklisieren. R = Rest der Peptidkette.

Von einigen Forschergruppen wird postuliert, dass nicht A β (1-42), sondern A β (N3pE)-42 den initialen Keim für die A β -Aggregation bildet, da es hydrophober ist, schlechter löslich ist und stärker zur Aggregation neigt (Schilling et al., 2006; Schlenzig et al., 2009). Zudem bewirkt seine Ringstruktur (s. Abb. 32) eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Abbau durch Proteasen. Eine initiale Ablagerung von A β (N3pE) ist, zumindest für die APP23 Mäuse, jedoch nicht anzunehmen, da es hier erst ab einem Alter von 15 Monaten in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte und parallel mit den A β (1-x) Peptiden altersabhängig akkumulierte. Aus den Migrationseigenschaften der in den Mausproben beobachteten A β (N3pE) Peptide in 1D- und 2D-Auftrennungen und dem Vergleich mit synthetischen Peptiden lässt sich schließen, dass amyloide Plaques in APP23 Mäusen vor allem A β (N3pE) enthalten das an Position 40 endet. Das beobachtete Muster an A β (N3pE)-Peptiden bildete ein ähnliches Muster wie die (1-x)-Peptide ab. Dies lässt vermuten, dass der chemische Prozess, der zu der Bildung von A β (N3pE)-Peptiden in den Mäusen führt, alle C-terminalen A β -Peptidvarianten in ähnlichem Maße betrifft. A β (N3pE)-Peptide entstehen vermutlich aus den N-terminal verkürzten A β (3-x)-Peptiden. A β (3-40) wurde in den Mausproben durch Massenspektrometrie eindeutig identifiziert. Es könnte entweder de novo bei der APP-Prozessierung oder sekundär, z.B. nach Ablagerung in amyloiden Plaques, durch Aminopeptidasen entstehen. Die anschließende Zyklisierung zu dem Pyroglutamat könnte in einem zeitabhängigen nicht-enzymatischen Prozess stattfinden. Alternativ wurde eine durch Glutaminylcyclase katalysierte Reaktion als Mechanismus vorgeschlagen (Schilling et al., 2004).

Auf der Suche nach weiteren möglicherweise krankheitsrelevanten Modifikationen des A β -Peptides, wurde das Auftreten von A β -Spots nach 2DE beobachtet, die einen saureren pI aufwiesen, als die anderen A β -Peptide. Diese Spots traten sowohl in humanen Gehirnproben als auch in Gehirnproben von APP23 Mäusen auf. Da diese Spots nicht in allen Proben gleich häufig waren, sondern vermehrt in der Ameisensäure-Fraktion auftraten und in den APP23 Mäusen mit dem Alter zuzunehmen schienen, wurde die chemische Struktur dieser Peptide im Detail untersucht. Die MALDI-TOF Analyse zeigte, dass sich in diesen Spots ein Peptid mit einer zusätzlichen Masse von 28 Da und eines mit einer zusätzlichen Masse von 43 Da befanden. Diese Modifikationen wurden durch MS/MS als eine Formylierung bzw. Carbamylierung der Amidgruppe des Aspartats in Position 1 identifiziert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten kritischen Kontroll-experimente deuten darauf hin, dass zumindest ein Teil der „sauren“ Spots nicht in einem

pathophysiologischen Prozess in den Mäusen entstanden ist, sondern artifiziell bei der Aufarbeitung der Proben durch den Kontakt mit Ameisensäure bzw. Harnstoff. Um eine artifizielle Formylierung während der Gewebeextraktion auszuschließen, wurde nach alternativen Extraktionsmethoden gesucht. Die von Pras beschriebene Wasser-Extraktionsmethode wurde bereits für eine Vielzahl von peripheren Amyloidosen eingesetzt (Klafki et al., 1992; Lundmark et al., 2002; Pras et al., 1968; Sletten et al., 1976; Westermarck und Sletten, 1982), nicht jedoch für die Extraktion des A β -Peptides und des Prion Proteins aus Gehirngewebe (Sipe und Cohen, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich diese Extraktionsmethode auch für das A β -Peptid eignet. Das hier bestimmte UV-Absorptionsmuster sowie das A β -Elutionsmuster der einzelnen Salz- und Wasserfraktionen war vergleichbar zu der Originalpublikation (Pras et al., 1968). Die Anwesenheit von Amyloidfibrillen in dem Wasserextrakt aus einem APP23 Mausgehirn ließ sich durch negative Kontrastierung und Elektronenmikroskopie bestätigen. Das 1D- und 2D-A β -Muster der Wasser-Fraktion war vergleichbar mit dem durch Ameisensäure-Extraktion erhaltenen, inklusive dem Auftreten von A β -Spots bei einem pI von ca. 4,7. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Beobachtung der stärker sauren A β -Spots ausschließlich auf die Ameisensäure-Behandlung zurückgeführt werden kann.

Die zweite identifizierte Modifikation, die N-Carbamylierung, könnte prinzipiell durch den während der IEF eingesetzten Harnstoff entstehen. Eine Carbamylierung des Amino-Terminus oder der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten ist ein viel diskutiertes Problem bei der 2DE. Die Relevanz unter sorgfältig kontrollierten experimentellen Bedingungen wurde jedoch auch von anderen Autoren in Frage gestellt (Herbert et al., 2003; Righetti, 2006). Die Verwendung von hoch reinem Harnstoff und eine Lagerung der Proben unter 37°C reduziert die Möglichkeit einer Carbamylierung auf ein Minimum (McCarthy et al., 2003). Diese methodischen Vorgaben wurden eingehalten. Zudem wurde ein Auftreten von „sauren“ A β Spots nach 2DE bei der Verwendung anderer Proben nicht beobachtet, obwohl Harnstoff immer eingesetzt wurde (s. z.B. 2D-Blots synthetischer Peptide, Abb. 9A; Maus CSF, Abb. 11; Zellkulturüberstände, Abb. 30). Um eine artifizielle Carbamylierung durch Harnstoff auszuschließen, wurde eine Methodik entwickelt mit der eine 2DE ohne die Verwendung von Harnstoff durchgeführt werden konnte. Auch nach Auftrennung einer Wasser-Amyloidpräparation nach Pras-Extraktion mit dieser 2D Variante traten abermals geringe Mengen der A β -Spots mit einem stärker sauren pI auf. Eine eindeutige massenspektrometrische Analyse dieser A β Spots, die durch Wasserextraktion nach Pras aufgearbeitet worden waren und zu keinem Zeitpunkt mit Ameisensäure oder Harnstoff in

Kontakt gekommen waren, war aufgrund geringer Ausbeuten nicht erfolgreich. Somit bleibt die Frage nach der zugrundeliegenden Ursache der pI-Verschiebung und der möglichen pathophysiologischen Relevanz der beobachteten stärker sauren A β -Peptide an dieser Stelle letztlich ungeklärt. Interessanterweise wurde in der Literatur über pathophysiologische Carbamylierung von Proteinen *in vivo* im Zusammenhang mit einer Nierendysfunktion und einer Urämie berichtet (Fluckiger et al., 1981; Kraus und Kraus, Jr., 2001). Neuere Untersuchungen deuten daraufhin, dass pathologische Carbamylierungen auch bei dem Katarakt (Zhang et al., 2008) und bei inflammatorischen Prozessen der Atherosklerose eine Rolle spielen können (Wang et al., 2007). Eine Neuroinflammation wird auch im Rahmen einer AD beobachtet, doch wäre ein Zusammenhang hier spekulativ.

4.3 A β -Peptide können Oberflächen abhängig aggregieren und zu Kreuzkontaminationen führen

Im Rahmen von analytischen und präparativen 2D Analysen stellte sich heraus, dass die für die IEF benötigten IPG-Streifenhalter Kreuzkontaminationen des A β -Peptides verursachen können, die sich mit den von dem Hersteller vorgeschlagenen Reinigungsmethoden nicht entfernen ließen. Um dieses Problem zu lösen wurde ein mehrstufiges Reinigungsprotokoll entworfen, das die mehrmalige Anwendung von Proteinase K beinhaltet. Die schlechte Löslichkeit der A β -Kontaminationen in SDS-haltigen Lösungen und die Resistenz gegenüber Proteolyse erinnert an die typischen Eigenschaften von Amyloidfibrillen im Allgemeinen (Glenner, 1980) und im Speziellen an die von A β aus amyloiden Plaques (Masters et al., 1985). Eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber der Behandlung mit Proteinase K ist auch ein Charakteristikum der infektiösen Form des Prion Proteins, einer weiteren Amyloidose (McKinley et al., 1983). Diese pathologische Form des Prion Proteins unterscheidet sich von der physiologischen durch ihre Sekundärstruktur, die vermehrt β -Faltblattstrukturen aufweist (Pan et al., 1993).

Die in dieser Arbeit eingesetzten IPG-Streifenhalter bestehen aus oberflächenbehandelter Aluminiumoxidkeramik (GE Healthcare, 2010). Aluminium wurde sowohl in den neurofibrillären Bündeln als auch in den amyloiden Plaques von Gehirnen von AD Patienten nachgewiesen (Good et al., 1992; Yumoto et al., 2009). In Untersuchungen *in vitro* konnte Aluminium die Konformation der A β -Peptide zu einer erhöhten β -Faltblattstruktur verschieben und dadurch deren Aggregation fördern (Ricchelli et al., 2005). Es ließe sich deshalb spekulieren, ob möglicherweise während der Inkubation der A β -Peptide in den

verwendeten IPG-Streifenhaltern Konformationsänderungen induziert wurden, die eine Ausbildung von fibrillären Strukturen, mit einem hohen Anteil an β -Falltblattstrukturen begünstigten. Dies wurde hier jedoch nicht weiter untersucht. Der Einfluss von Oberflächen auf das Aggregationsverhalten amyloidogener Proteine ist jedoch belegt. So konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der A β -Aggregation, sowie die Größe und Form der Aggregate abhängig sind von den physikochemischen Eigenschaften des Materials, mit dem das Peptid in Berührung kommt (Kowalewski und Holtzman, 1999). Dieses Phänomen wurde auch für eine amyloidogene Leichtkette beschrieben und als „oberflächenkatalysierte Amyloidfibrillen Bildung“ bezeichnet (Zhu et al., 2002). In der selben Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass auf hydrophoben Oberflächen, einschließlich Teflon, keine Adsorption des amyloidogenen Proteins statt findet. Dies konnte in dieser Arbeit auch bestätigt werden. Sowohl auf einer Teflon-, als auch auf einer Polystyrol-Oberfläche trat keine Adhäsion des A β -Peptides auf. Eine Strukturveränderung hin zu einer teilweisen Proteinase K Resistenz war jedoch auch auf der Aluminiumoxidkeramik Oberfläche erst nach einer IEF beobachtbar. Dies könnte auf einen Einfluss von pH und der lokalen Konzentration zurückzuführen sein. Durch die IEF werden die A β -Peptide an ihrem pI konzentriert und wie unter 4.1 beschrieben tritt die Fibrillenbildung nur oberhalb einer kritischen Konzentration ein. Zudem sind die Peptide an ihrem pI per Definitionem ungeladen, weisen somit bei diesem pH auch eine geringere Löslichkeit auf.

Die hier gemachten Beobachtungen könnten spezifisch für das eingesetzte Material sein. Es wurde hier nicht weiter untersucht, ob mit einer anderen IEF-Apparatur, von einem anderen Hersteller, bei dem Materialien aus Polystyrol eingesetzt werden, die gleichen Kontaminationsprobleme auftreten und die gleichen Reinigungsmethoden angewendet werden sollten. Auch wurde in dieser Arbeit die Gefahr von Kreuzkontaminationen bei der IEF nur für A β -Peptide untersucht. Es ist jedoch anzunehmen, dass andere amyloidogene oder zur Aggregation neigende Proteine ein ähnliches Verhalten zeigen könnten. Dies müsste individuell für jedes Protein und für die verwendete Apparatur untersucht werden. Für A β (1-42) konnten Kreuzkontaminationen bereits mit anderen Methoden beobachtet werden. Es wurde berichtet, dass bei der Analyse von A β -Peptiden aus Plasma durch eine Größenausschlusschromatographie A β -Peptide verschleppt wurden, wahrscheinlich durch eine Bindung des Peptides an das Festphasenmaterial der Säule und eine spätere unkontrolliert Elution (Kuo et al., 2000). Dies macht deutlich, wie wichtig es ist, bei dem Arbeiten mit hoch aggregierenden Substanzen, mögliche Kontaminationswege zu überprüfen und gegebenenfalls notwendige Maßnahmen zu ergreifen.

4.4 Verminderung der A β -Peptid Sekretion durch optimierte Tripartite β -Sekretaseinhibitoren

Unter den auf die Amyloidpathologie abzielenden Therapieansätzen gilt die Inhibierung der β -Sekretase, vor allem nachdem BACE1 kloniert und seine Struktur teilweise aufgeklärt werden konnte, als eine vielversprechende Möglichkeit (Vassar et al., 1999). Die BACE1 knock-out Mäuse wiesen einen relativ milden Phänotyp auf (Dominguez et al., 2005; Hu et al., 2006; Luo et al., 2001), so dass spekuliert wurde, dass bei einer BACE-Inhibierung im Menschen mit weniger schweren Nebenwirkungen zu rechnen wäre als bei der Gabe von γ -Sekretase Inhibitoren. Ein physiologisches Substrat der γ -Sekretase ist neben APP z.B. Notch, das eine wichtige Funktion beim Erhalt von Haut- und Darmepithelien sowie bei der B- und T-Zell-Entwicklung besitzt. Somit scheint die γ -Sekretase nur eingeschränkt als Angriffspunkt für neue Therapieansätze für die AD geeignet zu sein (Jakob-Roetne und Jacobsen, 2009). Eine Phase III Studie zu einem γ -Sekretase Inhibitor musste unlängst abgebrochen werden, da sich die Patienten klinisch verschlechterten und Nebenwirkungen wie z.B. Hautkrebs auftraten (Extance, 2010) (siehe auch Pressebericht von Eli Lilly and Company vom 17.08.10; <http://newsroom.lilly.com>). Die Wirkstoffentwicklung für BACE-Inhibitoren ging vergleichsweise langsamer voran und momentan befindet sich offenbar nur ein Kandidat (CTS-21166 von CoMentis) in einer frühen klinischen Studie (Jakob-Roetne und Jacobsen, 2009; Luo und Yan, 2010). Gründe hierfür waren, dass die ersten entwickelten BACE-Inhibitoren nur in *in vitro* Tests, nicht aber in Zellen wirksam waren (John V., 2003). Neuere Substanzen hingegen sind auch zellpermeabel, und kürzlich wurde eine im Tiermodell wirksame Substanz beschrieben, die jedoch relativ hohe Konzentrationen von 3 μ M für eine nur moderate Reduktion der A β -Produktion benötigte (Fukumoto et al., 2010).

Es konnte in dieser Arbeit, durch die Charakterisierung der biologischen Wirkung von neuartigen „Tripartite“ β -Sekretase Inhibitoren in Zellkulturmodellen, bestätigt werden, dass eine rationale Modulation eines bekannten Inhibitors zu einer erheblichen Erhöhung seiner Wirksamkeit führen kann. Das Konzept der „Tripartite“ Substanzen wurde 2005 erstmals anhand eines Patents vorgestellt (Braxmeier et al., 2005) und konnte in verschiedenen experimentellen Systemen bestätigt werden (Rajendran et al., 2008). Durch Kopplung des eigentlichen Pharmakophors an einen geeigneten Linker und einen Lipid-Anker soll bei den „Tripartite“ Substanzen eine selektive Anreicherung in den „Lipid Rafts“ erfolgen und eine geeignete Positionierung der Inhibitorgruppe erreicht werden. Der postulierte Wirkmechanismus und die Funktionen der einzelnen Module der „Tripartite“ Substanzen sind in Abb. 33 schematisch dargestellt.

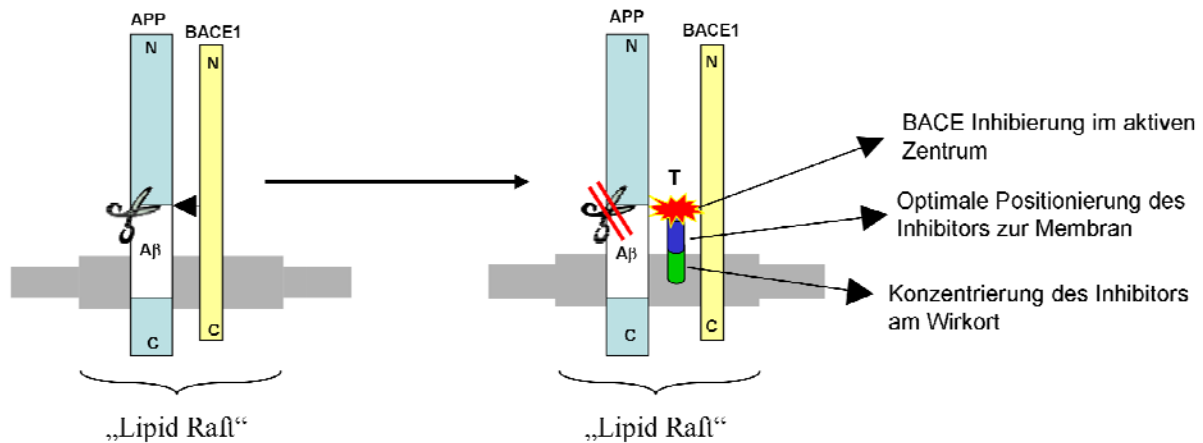


Abb. 33: Wirkmechanismus der „Tripartite“ Substanzen mit einem BACE Inhibitor.

APP wird in „Lipid Rafts“ von BACE1 gespalten. Der Lipid-Anker verankert die „Tripartite“ Substanzen in der Membran und führt im Falle des Cholesterol-Ankers zu einer Konzentrierung des Inhibitors in „Lipid Rafts“. Der Linker positioniert das Pharmaophor in einer optimalen Distanz zu der Membran, so dass es im aktiven Zentrum von BACE1 seine Funktion als ein Inhibitor des Übergangszustandes wahrnehmen kann. N = N-Terminus des Proteins; C = C-Terminus des Proteins; T = „Tripartite“ Substanz.

In allen drei in dieser Arbeit benutzten zellulären Testsystemen konnte eine drastische Verringerung der Aβ-Peptid Sekretion durch eine „Tripartite“ Substanz mit einem bekannten, nicht zellpermeablen BACE-Inhibitor als Pharmakophor erreicht werden. Eine direkte Inhibierung der Enzymaktivität von BACE wurde für eine rhodaminmarkierte Variante einer hier benutzten Substanz (Nr. 7 in Tabelle 7) bereits demonstriert (Braxmeier et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Konzentrationen der beiden APP-Produkte nach β-Sekretasespaltung, sAPPβ und CTFβ, durch die „Tripartite“ Substanzen reduziert wurden, was den postulierten Mechanismus der β-Sekretaseinhibition stark untermauert. Dabei traten die Wirkungen bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen auf, die Substanz mit der höchsten Potenz wies einen EC₅₀ von nur 370 pM in SH-SY5Y APPwt Zellen auf. Diese effektiven Konzentrationen lagen weit unterhalb der Konzentrationen, bei denen Einschränkungen in der Zellviabilität beobachtet wurden.

Die ersten getesteten „Tripartite“ Substanzen waren mit einem Dihydrocholesterol-Anker versehen, in der Annahme, dass „Lipid Rafts“ eine Rolle bei der APP-Prozessierung spielen. Der Austausch von Dihydrocholesterol durch andere, „nicht-raftophile“ Lipid-Anker führte zu einer verminderten Wirksamkeit und deutete darauf hin, dass die Effektivität der Substanzen abhängig war von der Assoziation des eingesetzten Lipid-Ankers mit „Lipid Rafts“. Im direkten Vergleich verschiedener Lipid-Anker konnte die Substanz mit dem Dihydrocholesterol-Anker den größten Effekt erzielen. Die Substanz, die einen Palmityl-

Anker enthielt, war ebenfalls in der Lage die A β -Peptid Sekretion effektiv zu senken, jedoch mussten höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Es ist anzunehmen, dass sich Substanzen mit einem Palmityl-Anker ebenfalls vermehrt in „Lipid Rafts“ ansammeln, da eine reversible Palmitoylierung von Proteinen zu einer regulierten Assoziation dieser Proteine mit „Lipid Rafts“ führen kann (Resh, 2006). Phospholipide und Sphingolipide in „Lipid Rafts“ enthalten hauptsächlich lange, gesättigte Fettsäurereste (Garner et al., 2007). Dies könnte den geringen Effekt der „Tripartite“ Substanz mit einem Myristyl-Anker erklären, der mit seiner eher kurzen Kohlenstoffkette mit 14 C-Atomen vermutlich eher in Membranregionen ausserhalb von „Lipid Rafts“ inseriert. Der Oleyl-Anker enthält eine cis-Doppelbindung in seiner Kohlenstoffkette. Diese verursacht einen Knick in der Struktur, der die dichte Packung der Lipide in „Lipid Rafts“ behindert. Phospholipide mit ungesättigten Fettsäureresten befinden sich deshalb fast ausschließlich ausserhalb von „Lipid Rafts“ (Simons und Ikonen, 1997). In Übereinstimmung damit reduzierte die Substanz mit dem Oleyl-Anker, genau wie die Substanz ohne Anker, bei den getesteten Konzentrationen, die A β -Peptid Sekretion nicht. Dies verdeutlicht, dass eine unselektive Membraninsertion des Inhibitors für einen optimalen Effekt nicht genügt, sondern bestimmte Membran-Kompartimente angesteuert werden müssen.

Ein Modell für die Spaltung von APP durch BACE in „Lipid Rafts“ wurde von der Arbeitsgruppe von Kai Simons vorgestellt. Sie postulierten, dass APP in der Plasmamembran in zwei Pools existiert, einer ausserhalb von „Lipid Rafts“, der andere „Raft-assoziiert“ (Ehehalt et al., 2003). Nach ihrem Modell (s. Abb. 34) würde die amyloidogene APP-Prozessierung, die durch die β -Sekretase eingeleitet wird, in „Lipid Rafts“ stattfinden. Dies wird durch eine weitere Untersuchung gestützt, in der BACE durch Kopplung an Glykosylphosphatidylinositol in „Lipid Rafts“ verankert wurde, was zu einem erhöhten β -Sekretase Schnitt führte (Cordy et al., 2003). Einzelne „Lipid Rafts“ sind mit einem Durchmesser von 50 nm relativ klein und enthalten nur etwa 20 Proteine (Pralle et al., 2000). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass APP und BACE sich in der gleichen „Lipid Raft“ Plattform begegnen. Dies könnte nach deren Endocytose und Ansammlung in Endosomen geschehen (Ehehalt et al., 2003). Nach dem in Abb. 34 vorgestellten Modell sollte die Spaltung durch α -Sekretase an der Plasmamembran in Regionen ausserhalb von „Lipid Rafts“ stattfinden. Sowohl in Zellen als auch in transgenen APP-Mäusen konnte gezeigt werden, dass nach einer Reduktion der zellulären Cholesterolkonzentration eine erhöhte α -Sekretase Spaltung beobachtbar ist (Kojro et al., 2001; Refolo et al., 2001). Kojro et al. (2001), führten

diesen Effekt auf eine Aktivierung der α -Sekretase ADAM10 zurück, Refolo et al. (2001) zeigten in ihren Mäusen, dass auch eine verminderte β -Sekretasespaltung stattfand. In der hier vorgelegten Arbeit konnte nach Behandlung der Zellen mit „Tripartite“ Substanzen, die eine Verminderung der A β -Sekretion bewirkten, ebenfalls eine erhöhte α -Sekretase Aktivität beobachtet werden, gemessen durch den Anstieg des APP-Spaltproduktes sAPP α . Die vermehrte α -Sekretase Aktivität könnte somit ein sekundärer kompensatorischer Effekt sein, möglicherweise durch eine Erhöhung der Substratmenge.

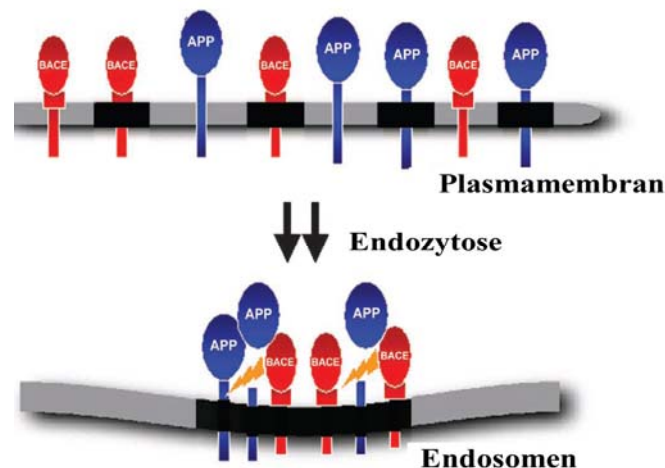


Abb. 34: Ein Modell für die „Lipid Raft“ assoziierte APP-Prozessierung durch BACE.

APP (blau) und BACE (rot) befinden sich in der Plasmamembran sowohl in „Lipid Rafts“ als auch in „nicht-Raft“ Regionen. APP und BACE aus unterschiedlichen „Raft-Domänen“ treffen nach der Endozytose in Endosomen aufeinander, wo die Spaltung von APP durch BACE statt finden kann. „Lipid Rafts“ sind durch schwarze Balken, Membrandomänen ausserhalb der Rafts als graue Balken dargestellt. Abb. verändert nach Ehehalt et al., 2003.

Durch die Verankerung des Inhibitors in der Membran ist er in seiner Beweglichkeit stark eingeschränkt. Eine direkte Kopplung an den Lipid-Anker würde den Inhibitor an der Membranoberfläche positionieren und womöglich eine Interaktion mit dem Substrat verhindern. Um eine exakte Positionierung des Inhibitors zu gewähren und somit einen optimalen Effekt der „Tripartite“ Struktur zu erreichen, wurden verschiedene Substanzen mit unterschiedlichen Linkerlängen verglichen. Eine effiziente Verminderung der A β -Peptid Sekretion in Zellkulturmodellen wurde mit „Tripartite“ Substanzen mit Linkerlängen von 35 Å - 89 Å beobachtet. Kürzere oder längere Linker waren hingegen wirkungslos, da wahrscheinlich keine Assoziation mehr zwischen Inhibitor und Zielmolekül ermöglicht wurde. Die Beobachtung, dass die β -Sekretase offenbar eine gewisse Toleranz bezüglich des Abstandes seines Substrates zur Membran aufweist, ist in Übereinstimmung mit älteren

publizierten APP-Deletionsstudien. Hier wurden fünf bzw. vier Aminosäuren an zwei verschiedenen Stellen des APP-Moleküls in der A β -Peptid Region zwischen Membraninsertions- und β -Schnittstelle deletiert. Dies verhinderte jedoch nicht die Spaltung durch β -Sekretase, obwohl sich der Abstand zu der Membran verringert hatte (Citron et al., 1995). Um detailliert den Einfluss der Linkerlängen im Bereich von 35 Å – 89 Å auf die A β -Peptid Sekretion zu analysieren wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Als optimale Linkerlänge wurde, zumindest unter den hier getesteten, eine Länge von 89 Å bestimmt. Dieses Ergebnis wurde in jedem der durchgeführten Einzelexperimente ($n = 3$) und ebenfalls nach der Berechnung der Dosis-Wirkungskurven aus den jeweils kombinierten Datensätzen für APPwt und für APPsw exprimierende Zellen gefunden. Da sowohl APP als auch BACE Transmembranproteine sind, wurden bisher, soweit bekannt, keine Röntgenstrukturen der gesamten Proteine veröffentlicht. Eine Abschätzung von geeigneten Linkerlängen kann jedoch aufgrund der APP-Sequenz gemacht werden. Die β -Sekretasespaltungsstelle befindet sich 29 Aminosäuren von der Membraninsertionsstelle entfernt (De Strooper und Annaert, 2000). Die Sekundärstruktur ist nicht bekannt, die möglichen Extreme wären eine α -Helix oder eine gestreckte Form (ähnlich wie in einem β -Faltblatt). Die Windung einer α -Helix ist 5,4 Å lang und umfasst 3,6 Aminosäurereste, bei einer gestreckten Konformation im β -Faltblatt ist ein Peptidrest 3,5 Å lang. Dies würde bei 29 Aminosäuren eine Länge von 43,5 Å für eine durchgängige α -Helix bzw. 101,5 Å für eine gestreckte Form ergeben. Die hier ermittelte optimale Linkerlänge von 89 Å liegt zwischen diesen Extremwerten. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Substanz mit der zweithöchsten Potenz eine Linkerlänge von 47 Å aufwies, was ungefähr der berechneten Länge entspricht, die dieser Abschnitt bei einer α -Helix Konformation hätte. Dies unterstreicht weiterhin die Flexibilität die BACE gegenüber seinem Substrat aufweist.

Die Berechnung der EC₅₀-Werte zeigte, dass der untersuchte Inhibitor eine deutlich höhere Potenz für APPwt als für APPsw aufwies. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mutiertes APP mit der schwedischen Mutation ein besseres Substrat für BACE ist (Gruninger-Leitch et al., 2002) und es sich bei Inhibitor 1 um einen kompetitiven Inhibitor handelt. Für die enzymatische Spaltung von APPsw durch BACE wurde eine ca. 8fach höhere Spezifitätskonstante (Verhältnis der Wechselzahl k_{cat} zu der Michaelis-Konstante K_m) als für APPwt berechnet (Gruninger-Leitch et al., 2002). In einer neueren Untersuchung, in der die Wirksamkeit eines anderen BACE Inhibitors auf APPwt und auf APPsw in einem Zellmodell untersucht wurde, wurden 10fach niedrigere EC₅₀ Werte für APPwt als für APPsw ermittelt

(Yamakawa et al., 2010). Dies ist mit den in dieser Arbeit erhaltenen Werten vergleichbar. Yamakawa und Kollegen erklärten dies durch eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der β -Sekretase Spaltung von APPsw.

Hochauflösende 1D und 2D Western-Blots von Zellkulturüberständen zeigten, dass CTN und SH-SY5Y APPwt Zellen neben den A β -Peptiden A β (1-37), -(1-38), -(1-39), -(1-40) und -(1-42) bestimmte A β -Peptidvarianten sezernierten, die nicht in Zellkulturüberständen von SH-SY5Y APPsw Zellen beobachtet wurden. Die Konzentration dieser Peptide wurde durch die Behandlung der Zellen mit „Tripartite“ Substanzen mit zwei verschiedenen Inhibitoren nicht verringert, was darauf hindeutet, dass sie vermutlich unabhängig von BACE entstehen. Die Beobachtung eines veränderten pI-Wertes könnte ein Hinweis für einen anderen N-Terminus als Asp(1) sein.

Die Entstehung von A β -Peptiden aus APPwt, die neben dem Aspartat an Position 1 auch andere N-Termini aufweisen, wurde bereits beschrieben (Cescato et al., 2000; Haass et al., 1995). In einer dieser Studien wurden die Zellen mit Bafilomycin A1 behandelt, einem Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase, was zu einem Anstieg des endosomalen pHs führt (Haass et al., 1995). Die Zellen sezernierten daraufhin alternative A β -Peptide mit N-Termini an Position -3 bzw. 4 des A β -Peptides. Der Effekt konnte jedoch nicht in Zellen reproduziert werden, die APPsw exprimierten, bei denen eine starke Reduktion der Konzentration der sezernierten A β -Peptide beobachtet wurde. Dies wurde als Hinweis für die Existenz verschiedener Proteasen mit β -Sekretase Aktivität gedeutet. Diese mutmaßliche alternative β -Sekretase kann möglicherweise wegen der veränderten Sequenz APPsw nicht spalten oder APPsw könnte aufgrund einer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation für die alternative β -Sekretase nicht zugänglich sein. Cescato und Kollegen (2000) transfizierten Zellen mit einem endocytose-defizientem APP, das folglich an der Plasmamembran akkumulierte und identifizierten in den Zellkulturüberständen ebenfalls A β -Peptide mit alternativen N-Termini. Sie postulierten, dass deren N-Terminus sich an Position 3 bzw. 5 der A β -Peptidsequenz befindet (Cescato et al., 2000).

Viele Studien aus den letzten Jahren haben die wichtige Funktion von BACE bei der APP-Prozessierung und Generierung von A β -Peptiden aufgezeigt und BACE gilt als die hauptsächliche β -Sekretase. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit deutlich. So trat nach BACE-Inhibierung in Zellkulturen eine starke Reduktion der A β -Gesamtkonzentration ein. Die A β -Peptide aus SH-SY5Y APPwt Zellen mit einem basischeren pI, bei denen es sich höchst wahrscheinlich um N-terminal trunkierte A β -Peptide handelt, die anscheinend nicht

durch BACE Prozessierung entstehen, machte nur einen kleinen Bruchteil der A β -Gesamtmenge aus. Doch könnte eine alternative Proteolyse des APPs nach BACE-Inhibierung zu deren erhöhten Produktion führen, was sich in den hier gezeigten Ergebnissen auch andeutete.

Die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Amyloidablagerungen in transgenen APP23 Mäusen im Vergleich zu humanen Proben hinsichtlich der verschiedenen A β -Peptidvarianten. Somit muß die Verwendung von transgenen Tiermodellen, bei denen mutiertes APP überexprimiert wird, zur Untersuchung von pathophysiologischen Mechanismen der AD und zur präklinischen Testung von möglichen Kandidaten für neue Medikamente, kritisch betrachtet werden. Die im zweiten Teil der Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur biologischen Aktivität von neuartigen „Tripartite“ BACE-Inhibitoren bestätigen die Möglichkeit, die Wirksamkeit bestimmter Pharmakophore durch gezielte Verankerung in Mikrodomänen der Membran zu verbessern. Auch im Rahmen dieser Untersuchungen wurden auffällige Unterschiede beim Vergleich von APPwt mit mutiertem APPsw beobachtet.

5. Zusammenfassung

Die genaue Pathogenese der AD ist noch ungeklärt, doch wird angenommen, dass die Aggregation und Akkumulation von bestimmten Formen des A β -Peptides den Auslöser für die nachfolgenden pathologischen Mechanismen bildet. Als experimentelle Modelle für die charakteristische Amyloidpathologie der AD und für die Untersuchung von möglichen auf β -Amyloid abzielenden Therapieansätzen, werden häufig transgene Mäuse eingesetzt, die mutierte APP-Varianten exprimieren.

In einem ersten Teilprojekt dieser Arbeit sollte die altersabhängige Amyloidpathologie der APP23 Mäuse, die humanes APP mit der schwedischen Mutation exprimieren, biochemisch untersucht werden und mit humanen Alzheimer Proben verglichen werden. Ein Schwerpunkt sollte dabei der Analyse verschiedener Modifikationen des A β -Peptides gelten. In den APP23 Mäusen, wurde ein exponentieller zeitlicher Verlauf der A β -Akkumulation beobachtet, der im Einklang steht mit der „Keim-Theorie“ für die Aggregation von amyloidogenen Proteinen. Es zeigten sich grundlegende Unterschiede in der Zusammensetzung der amyloiden Ablagerungen zwischen Maus und Mensch. Während beim Menschen hauptsächlich A β 42 abgelagert wurde, war die Hauptmenge bei der Maus das am C-Terminus um zwei Aminosäurereste kürzere A β 40. Desweiteren enthielten die humanen Plaques verschiedene N-terminal trunkierte A β Variationen, von denen eine A β -Form, die an Position 3 mit einem Pyroglutamat beginnt, die Hauptmenge darstellte. Diese konnten auch in den APP23 Mäusen nachgewiesen werden, jedoch in weitaus geringeren Mengen als beim Menschen. Dies verdeutlicht, dass die APP23 Mäuse die humane Amyloidpathologie nur unvollständig abbilden.

Aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften des hydrophoben, zur Aggregation neigenden A β -Peptides ergaben sich methodische Schwierigkeiten. Deshalb wurde eine Extraktionsmethode, die für die Extraktion von Amyloidproteinen bei peripheren Amyloidosen entwickelt wurde, modifiziert und erstmals auf die Gewebextraktion von A β angewendet. Dadurch gelang es, das Amyloid aus dem Gewebe in Reinstwasser zu lösen und die fibrilläre Struktur im Elektronenmikroskop darzustellen. Kontaminationsproblemen bei der 2DE durch adhäsive A β -Peptide, wurden durch die Entwicklung eines mehrstufigen Reinigungsprotokolls, das die Behandlung mit Proteinase K einschließt, begegnet.

In einem zweiten Teilprojekt sollten in primären neuronalen Zellen und in Zelllinien membranverankerte BACE Inhibitoren mit verschiedenen Pharmakophoren, unterschiedlichen Linkerlängen und Variationen von Lipid-Ankern charakterisiert werden.

BACE ist die hauptsächliche β -Sekretase, die enzymatische Aktivität, die den ersten Schritt bei der A β -Generierung katalysiert. Der mittels Dihydrocholesterol und einem 89 Å Linker in der Membran verankerte Inhibitor war in allen Zellmodellen weitaus effektiver als der entsprechende freie Inhibitor in der Reduktion der Menge an sezernierten A β -Peptiden. Es zeigte sich, dass Inhibitoren, die einen Anker enthielten, der vornehmlich in „Lipid Raft“ inserierte, effektiver waren als andere, weniger oder nicht „raftophile“ Lipid-Anker. Desweiteren konnte durch Anpassung des Abstandes des Inhibitors von der Membran, der Inhibitor weiter optimiert werden. Interessanterweise hatten die Inhibitoren unterschiedliche Effekte auf Wild-Typ APP und auf APP mit der schwedischen Doppelmutation, die sich direkt vor der β -Sekretase Schnittstelle im APP befindet. In der Gegenwart von BACE-Inhibitoren entstanden aus APP Wild-Typ geringe Mengen an A β -Peptiden, die möglicherweise modifizierte N-Termini aufwiesen und nicht in den mit APP_{sw} transfizierten Zellen detektiert wurden. Da N-terminal modifizierte und / oder verkürzte A β -Peptide einen großen Anteil in humanen Plaques ausmachen, könnte deren Entstehung pathophysiologische Bedeutung haben.

6. Ausblick

Trotz intensiver Forschung konnte bisher, mehr als 100 Jahre nach Alois Alzheimers Bericht „Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde“ (Alzheimer, 1907), keine Therapie entwickelt werden, die den Krankheitsprozess aufhält. In APP-transgenen Mäusen hingegen wurden bisher mehr als 200 erfolgreiche Interventionen beschrieben, die zu einer Verminderung der Amyloidpathologie bzw. der „kognitiven Defizite“ der Mäuse führten (Zahs und Ashe, 2010). Viele wurden darauf hin in klinischen Studien auch am Menschen getestet, blieben jedoch bisher alle weitgehend erfolglos.

In humanen Plaques wird im Vergleich zu den APP23 Mäusen generell eine größere Heterogenität der A β -Peptide beobachtet, besonders jedoch im Bezug auf den N-Terminus des Peptides. Die Frage, wie diese Peptide entstehen, bleibt noch unbeantwortet. Eine Spaltung der A β -Peptide durch Aminopeptidasen nach ihrer Ablagerung wäre ein möglicher Mechanismus. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass diese Peptide direkt durch Spaltung von APP entstehen. Hierfür spricht, dass N-terminal trunkierte A β -Peptide ein fester Bestandteil des Blutplasmas sind, sowohl von AD-Patienten als auch von gesunden Kontrollen (Maler et al., 2007), und monocytäre Zellen diese A β -Spezies regelmäßig sezernieren (Spitzer et al., 2010). Die hier im zweiten Teil der Arbeit anhand von Zellkulturen gewonnenen Erkenntnisse zur Wirkung der „Tripartite“ Substanzen könnten zur Aufklärung dieser Frage beitragen. Es wurden A β -Peptide identifiziert, die resistent gegenüber einer BACE-Inhibierung waren und bei denen es sich vermutlich um N-terminal trunkierte A β -Peptide handelt. In weiterführenden Studien könnte untersucht werden, welche Protease für die Spaltung dieser alternativen A β -Peptide verantwortlich ist. Hierzu könnte durch pharmakologische Beeinflussung zunächst geklärt werden, welches Organell bzw. welches Membrankompartiment als Ort für diese Prozessierung in Frage käme. Daran anknüpfend stellt sich die Frage, welche Proteasen sich in diesem Kompartiment befinden und welche aufgrund ihrer Sequenzspezifität APP spalten könnten. Hierfür ließen sich neue gezielt modifizierte „Tripartite“ Substanzen benutzen. Da APP ein Transmembranprotein ist, könnten alternative β -Sekretasen ebenfalls Transmembranproteine oder zumindest Membran-assoziiert sein. Das Prinzip der Synthese der „Tripartite“ Substanzen ermöglicht einen relativ einfachen Austausch der Module, so dass mit verschiedenen Inhibitorklassen zunächst ein Screening auf mögliche Kandidaten durchgeführt werden könnte. Die mögliche Bedeutung der Entstehung N-terminal trunkierter A β -Peptide wird verdeutlicht durch A β (N3pE), das bis zu 50% der A β -Peptide in humanen Plaques ausmachen kann (siehe auch 4.2). Es sollte geklärt werden, ob

nach Inhibierung von BACE APP auf einem alternativen Weg prozessiert werden kann, der zur erhöhten Bildung eines Peptides führen könnte, dass womöglich ein Vorläufer des A β (N3pE)s ist.

Es konnte hier gezeigt werden, wie sich die Struktur der „Tripartite“ Substanzen modulieren lässt, so dass seine Eigenschaften optimiert werden. Diese Substanzen könnten als Leitstruktur dienen, für die Entwicklung neuerer BACE Inhibitoren. Entscheidend für eine klinische Anwendbarkeit der „Tripartite“ Substanzen wäre eine Blut-Hirn-Schranken Gängigkeit, die überprüft werden müsste. Unabhängig davon eignen sich diese Substanzen hervorragend für zelluläre Untersuchungen zur Physiologie der APP-Prozessierung, da sie älteren BACE Inhibitoren weit überlegen sind. Unter Verwendung einer Rhodamin-markierten Variante der „Tripartite“ Substanzen könnten in weitergehenden Untersuchungen die genaue Lokalisation der „Tripartite“ Substanzen und die Ko-Lokalisation mit anderen Proteinen verfolgt werden und der Transport verschiedener Lipid-Anker zu subzellulären Kompartimenten untersucht werden. Damit könnte die Frage geklärt werden, ob die beobachteten Unterschiede in der Wirkung der „Tripartite“ Substanzen auf APPwt und APPsw sich teilweise durch eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation erklären lassen.

7. Literaturverzeichnis

- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin* 64, 146-148.
- Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S. und Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 231-235.
- Atwood, C. S., Martins, R. N., Smith, M. A. und Perry, G. (2002). Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides* 23, 1343-1350.
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J. S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J. A., Sisodia, S.S., Checler, F., Chretien, M. und Seidah, N. G. (2001). Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* 276, 10879-10887.
- Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M. und Vassar, R. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 20647-20651.
- Bibl, M., Mollenhauer, B., Esselmann, H., Lewczuk, P., Klafki, H. W., Sparbier, K., Smirnov, A., Cepek, L., Trenkwalder, C., Rütger, E., Kornhuber, J., Otto, M. und Wiltfang, J. (2006). CSF amyloid-beta-peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Brain* 129, 1177-1187.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95.
- Braak, H. und Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
- Braak, H., Braak, E. und Bohl, J. (1993). Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur. Neurol.* 33, 403-408.
- Braxmeier, T., Friedrichson, T., Fröhner, W., Jennings, G., Munick, M., Schlechtingen, G., Schröder, C., Knölker, H.J., Simons, K., Zerial, M. und Kurzchalia, T. (2005). International Patent, WO 2005/097199.
- Brayne, C., Richardson, K., Matthews, F. E., Fleming, J., Hunter, S., Xuereb, J. H., Paykel, E., Mukaetova-Ladinska, E. B., Huppert, F. A., O'Sullivan, A. und Denney, T. (2009). Neuropathological correlates of dementia in over-80-year-old brain donors from the population-based Cambridge city over-75s cohort (CC75C) study. *J. Alzheimers. Dis.* 18, 645-658.
- Brown, D. A. und London, E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* 164, 103-114.
- Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P. und Yankner, B. A. (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 2092-2096.
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. und Black, R. A. (1998a). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765-27767.
- Buxbaum, J. D., Thinakaran, G., Koliatsos, V., O'Callahan, J., Slunt, H. H., Price, D. L. und Sisodia, S. S. (1998b). Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J. Neurosci.* 18, 9629-9637.
- Buxbaum, J. D., Cullen, E. I. und Friedhoff, L. T. (2002). Pharmacological concentrations of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin decrease the formation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro and in patients. *Front Biosci.* 7, a50-a59.

- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. und Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 233-234.
- Cai, X. D., Golde, T. E. und Younkin, S. G. (1993). Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259, 514-516.
- Calhoun, M. E., Wiederhold, K. H., Abramowski, D., Phinney, A. L., Probst, A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B. und Jucker, M. (1998). Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395, 755-756.
- Calhoun, M. E., Burgermeister, P., Phinney, A. L., Stalder, M., Tolnay, M., Wiederhold, K. H., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Sommer, B., Staufenbiel, M. und Jucker, M. (1999). Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14088-14093.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A. und Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 664-670.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. und Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Carrodegua, J. A., Rodolose, A., Garza, M. V., Sanz-Clemente, A., Perez-Pe, R., Lacosta, A. M., Dominguez, L., Monleon, I., Sanchez-Diaz, R., Sorribas, V. und Sarasa, M. (2005). The chick embryo appears as a natural model for research in beta-amyloid precursor protein processing. *Neuroscience* 134, 1285-1300.
- Castano, E. M., Prelli, F., Soto, C., Beavis, R., Matsubara, E., Shoji, M. und Frangione, B. (1996). The length of amyloid-beta in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Dutch type. Implications for the role of amyloid-beta 1-42 in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271, 32185-32191.
- Cescato, R., Dumermuth, E., Spiess, M. und Paganetti, P. A. (2000). Increased generation of alternatively cleaved beta-amyloid peptides in cells expressing mutants of the amyloid precursor protein defective in endocytosis. *J. Neurochem.* 74, 1131-1139.
- Chen, W. J., Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 3116-3123.
- Citron, M., Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661-670.
- Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 387-398.
- Cohen, A. S. und Calkins, E. (1959). Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183, 1202-1203.
- Cordy, J. M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N. M. und Turner, A. J. (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 11735-11740.
- Correia, J. J., Lipscomb, L. D. und Lobert, S. (1993). Nondisulfide crosslinking and chemical cleavage of tubulin subunits: pH and temperature dependence. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 105-114.
- De Jonghe C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Serneels, S., Checler, F., Annaert, W., Van Broeckhoven, C. und De Strooper, B. (2001). Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1665-1671.

- De Strooper, B. und Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* 113, 1857-1870.
- Delacourte, A. und Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76, 173-186.
- Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I. E., Marjaux, E., Craessaerts, K., Roebroek, A. J., Schwake, M., D'Hooge, R., Bach, P., Kalinke, U., Moechars, D., Alzheimer, C., Reiss, K., Saftig, P. und De Strooper, B. (2005). Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 280, 30797-30806.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. und Younkin, S. (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710-713.
- Duyckaerts, C., Potier, M. C. und Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 5-38.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. und Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album Limber.* *Eur. J. Biochem.* 47, 91-97.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H. und Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486-488.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. und Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113-123.
- Ellis, R. J., Olichney, J. M., Thal, L. J., Mirra, S. S., Morris, J. C., Beekly, D. und Heyman, A. (1996). Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology* 46, 1592-1596.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D. und Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Extnance, A. (2010). Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 749-751.
- Fagan, A. M., Mintun, M. A., Mach, R. H., Lee, S. Y., Dence, C. S., Shah, A. R., LaRossa, G. N., Spinner, M. L., Klunk, W. E., Mathis, C. A., DeKosky, S. T., Morris, J. C. und Holtzman, D. M. (2006). Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann. Neurol.* 59, 512-519.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K. und Hartmann, T. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5856-5861.
- Fluckiger, R., Harmon, W., Meier, W., Loo, S. und Gabbay, K. H. (1981). Hemoglobin carbamylation in uremia. *N. Engl. J. Med.* 304, 823-827.
- Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condrón, M. M., Teplow, D. B., Haass, C. und Walter, J. (2002). A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J. Neurochem.* 81, 1011-1020.
- Fonseca, M. I., Head, E., Velazquez, P., Cotman, C. W. und Tenner, A. J. (1999). The presence of isoaspartic acid in beta-amyloid plaques indicates plaque age. *Exp. Neurol.* 157, 277-288.

- Fukumoto, H., Takahashi, H., Tarui, N., Matsui, J., Tomita, T., Hirode, M., Sagayama, M., Maeda, R., Kawamoto, M., Hirai, K., Terauchi, J., Sakura, Y., Kakihana, M., Kato, K., Iwatsubo, T. und Miyamoto, M. (2010). A noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates Abeta pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 30, 11157-11166.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido T., Hagopian S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, L., Penniman, E., Power, M., Schenk, D., Seubert, P., Snyder, B., Soriano, F., Tan, H., Vitale, J., Wadsworth, S., Wozolzin, B. und Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Garner, A. E., Smith, D. A. und Hooper, N. M. (2007). Sphingomyelin chain length influences the distribution of GPI-anchored proteins in rafts in supported lipid bilayers. *Mol. Membr. Biol.* 24, 233-242.
- GE Healthcare. (2010). 2-D Electrophoresis, Principles and Methods.
- Glenner, G. G. (1980). Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 302, 1283-1292.
- Glenner, G. G. und Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.
- Good, P. F., Perl, D. P., Bierer, L. M. und Schmeidler, J. (1992). Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann. Neurol.* 31, 286-292.
- Görg, A., Postel, W. und Gunther, S. (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Gouras, G. K., Xu, H., Jovanovic, J. N., Buxbaum, J. D., Wang, R., Greengard, P., Relkin, N. R. und Gandy, S. (1998). Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons. *J. Neurochem.* 71, 1920-1925.
- Gralle, M. und Ferreira, S. T. (2007). Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog. Neurobiol.* 82, 11-32.
- Grimmer, T., Riemenschneider, M., Forstl, H., Henriksen, G., Klunk, W. E., Mathis, C. A., Shiga, T., Wester, H. J., Kurz, A. und Drzezga, A. (2009). Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid. *Biol. Psychiatry* 65, 927-934.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. und Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 4913-4917.
- Gruninger-Leitch, F., Schlatter, D., Kung, E., Nelbock, P. und Dobeli, H. (2002). Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J. Biol. Chem.* 277, 4687-4693.
- Güntert, A., Dobeli, H. und Bohrmann, B. (2006). High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143, 461-475.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. und Selkoe D. J. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.
- Haass, C., Capell, A., Citron, M., Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1995). The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 270, 6186-6192.

- Hardy, J. A. und Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harper, J. D. und Lansbury, P. T., Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 385-407.
- Heart Protection Study Collaborative Group. (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360, 7-22.
- Helms, J. B. und Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5, 247-254.
- Herbert, B., Hopwood, F., Oxley, D., McCarthy, J., Laver, M., Grinyer, J., Goodall, A., Williams, K., Castagna, A. und Righetti, P. G. (2003). Beta-elimination: an unexpected artefact in proteome analysis. *Proteomics* 3, 826-831.
- Hesse, C., Rosengren, L., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Jensen, C., Davidsson, P. und Blennow, K. (2000). Cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease evaluated after acute ischemic stroke. *J. Alzheimers. Dis.* 2, 199-206.
- Hill, H. D. und Straka, J. G. (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal. Biochem.* 170, 203-208.
- Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C. M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K. und Duff, K. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* 4, 97-100.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. und Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D. und Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat. Neurosci.* 9, 1520-1525.
- Hung, A. Y. und Selkoe, D. J. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 534-542.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M. und Doms, R. W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 275, 33729-33737.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C. und Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell Neurosci.* 14, 419-427.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schroder, J., Zerfass, R., Forstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1996). Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J. Biol. Chem.* 271, 22908-22914.
- Ikin, A. F., Annaert, W. G., Takei, K., De Camilli, P., Jahn, R., Greengard, P. und Buxbaum, J. D. (1996). Alzheimer amyloid protein precursor is localized in nerve terminal preparations to Rab5-containing vesicular organelles distinct from those implicated in the synaptic vesicle pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 31783-31786.

- Irizarry, M. C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K. J., Schenk, D., Games, D. und Hyman, B. T. (1997). Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J. Neurosci.* 17, 7053-7059.
- Ishiguro, K., Ohno, H., Arai, H., Yamaguchi, H., Urakami, K., Park, J. M., Sato, K., Kohno, H. und Imahori, K. (1999). Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 270, 91-94.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. und Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45-53.
- Jakob-Roetne, R. und Jacobsen, H. (2009). Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 3030-3059.
- Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I. und Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* 12, 23-34.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P. und Lansbury, P. T., Jr. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697.
- Jarrett, J. T. und Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.
- Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S. und Drachman, D. A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627-1631.
- John, V. (2003). International Patent, WO 03/045378.
- Kalback, W., Watson, M. D., Kokjohn, T. A., Kuo, Y. M., Weiss, N., Luehrs, D. C., Lopez, J., Brune, D., Sisodia, S. S., Staufenbiel, M., Emmerling, M. und Roher, A. E. (2002). APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques. *Biochemistry* 41, 922-928.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kawooya, J. K., Emmons, T. L., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Camp, M. C. und D'Andrea, S. C. (2003). Electrophoretic mobility of Alzheimer's amyloid-beta peptides in urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 323, 103-113.
- Kester, M. I. und Scheltens, P. (2009). Dementia: the bare essentials. *Pract. Neurol.* 9, 241-251.
- Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192-193.
- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C. und Hyman, B. T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J. Cell Sci.* 116, 3339-3346.
- Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J. und Nissinen, A. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447-1451.
- Klafki, H. W., Kratzin, H. D., Pick, A. I., Eckart, K., Karas, M. und Hilschmann, N. (1992). Complete amino acid sequence determinations demonstrate identity of the urinary Bence Jones protein (BJP-DIA) and the amyloid fibril protein (AL-DIA) in a case of AL-amyloidosis. *Biochemistry* 31, 3265-3272.

- Klafki, H. W., Wiltfang, J. und Staufenbiel, M. (1996). Electrophoretic separation of betaA4 peptides (1-40) and (1-42). *Anal. Biochem.* 237, 24-29.
- Klafki, H. W., Staufenbiel, M., Kornhuber, J. und Wiltfang, J. (2006). Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* 129, 2840-2855.
- Klunk, W. E. und Pettegrew, J. W. (1990). Alzheimer's beta-amyloid protein is covalently modified when dissolved in formic acid. *J. Neurochem.* 54, 2050-2056.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. und Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5815-5820.
- Kowalewski, T. und Holtzman, D. M. (1999). In situ atomic force microscopy study of Alzheimer's beta-amyloid peptide on different substrates: new insights into mechanism of beta-sheet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3688-3693.
- Kraus, L. M. und Kraus, A. P., Jr. (2001). Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int. Suppl* 78, S102-S107.
- Kumar-Singh, S., De Jonghe, C., Cruts, M., Kleinert, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Lofgren, A., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Kroisel, P. M. und Van Broeckhoven, C. (2000). Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2589-2598.
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J. und Roher, A. E. (1997). Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 188-191.
- Kuo, Y. M., Kokjohn, T. A., Kalback, W., Luehrs, D., Galasko, D. R., Chevallier, N., Koo, E. H., Emmerling, M. R. und Roher, A. E. (2000). Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 750-756.
- Kuo, Y. M., Kokjohn, T. A., Beach, T. G., Sue, L. I., Brune, D., Lopez, J. C., Kalback, W. M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M. und Roher, A. E. (2001). Comparative analysis of amyloid-beta chemical structure and amyloid plaque morphology of transgenic mouse and Alzheimer's disease brains. *J. Biol. Chem.* 276, 12991-12998.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. und Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3922-3927.
- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lemere, C. A., Blusztajn, J. K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. C. und Selkoe, D. J. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Dis.* 3, 16-32.
- LeVine, H., III. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2, 404-410.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D. und Schellenberg, G. D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Bibl, M., Paul, S., Svitek, J., Miertschischk, J., Meyrer, R., Smirnov, A., Maler, J. M., Klein, C., Otto, M., Bleich, S., Sperling, W., Kornhuber, J., Rütger, E. und Wiltfang, J. (2004a). Electrophoretic separation of amyloid beta peptides in plasma. *Electrophoresis* 25, 3336-3343.

- Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, J. M., Henkel, A. W., Henkel, M. K., Eikenberg, O., Antz, C., Krause, W. R., Reulbach, U., Kornhuber, J. und Wiltfang, J. (2004b). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A β 42, A β 42/A β 40 ratio and total tau. *Neurobiol. Aging* 25, 273-281.
- Lewczuk, P. und Wiltfang, J. (2008). Neurochemical dementia diagnostics: State of the art and research perspectives. *Proteomics* 8, 1292-1301.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M. und McGowan, E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-1491.
- Li, L., Cao, D., Garber, D. W., Kim, H. und Fukuchi, K. (2003). Association of aortic atherosclerosis with cerebral beta-amyloidosis and learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 163, 2155-2164.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A. und Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1456-1460.
- Lobo, A., Launer, L. J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di, C. A., Breteler, M. M., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Jagger, C., Martinez-Lage, J., Soininen, H. und Hofman, A. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54, S4-S9.
- Lundmark, K., Westermarck, G. T., Nystrom, S., Murphy, C. L., Solomon, A. und Westermarck, P. (2002). Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6979-6984.
- Luo, X. und Yan, R. (2010). Inhibition of BACE1 for therapeutic use in Alzheimer's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3, 618-628.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M. und Vassar, R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* 4, 231-232.
- Maler, J. M., Klafki, H. W., Paul, S., Spitzer, P., Groemer, T. W., Henkel, A. W., Esselmann, H., Lewczuk, P., Kornhuber, J. und Wiltfang, J. (2007). Urea-based two-dimensional electrophoresis of beta-amyloid peptides in human plasma: evidence for novel A β species. *Proteomics* 7, 3815-3820.
- Mandelkow, E. M., Herrmann, M. und Ruhl, U. (1985). Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies. *J. Mol. Biol.* 185, 311-327.
- Marcinkiewicz, M. und Seidah, N. G. (2000). Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J. Neurochem.* 75, 2133-2143.
- Marquez-Sterling, N. R., Lo, A. C., Sisodia, S. S. und Koo, E. H. (1997). Trafficking of cell-surface beta-amyloid precursor protein: evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling. *J. Neurosci.* 17, 140-151.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. und Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 4245-4249.
- Maurer, K., Volk, S. und Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546-1549.
- McCarthy, J., Hopwood, F., Oxley, D., Laver, M., Castagna, A., Righetti, P. G., Williams, K. und Herbert, B. (2003). Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis - myth or reality? *J. Proteome. Res.* 2, 239-242.

- McGowan, E., Sanders, S., Iwatsubo, T., Takeuchi, A., Saido, T., Zehr, C., Yu, X., Uljon, S., Wang, R., Mann, D., Dickson, D. und Duff, K. (1999). Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol. Dis.* 6, 231-244.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. und Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G. und Brown, D. A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* 274, 3910-3917.
- Miller, D. L., Papayannopoulos, I. A., Styles, J., Bobin, S. A., Lin, Y. Y., Biemann, K. und Iqbal, K. (1993). Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 301, 41-52.
- Missmahl, H. P. und Hartwig, M. (1953). Optical polarization studies of amyloid substance. *Virchows Arch.* 324, 489-508.
- Morgan, C., Colombres, M., Nunez, M. T. und Inestrosa, N. C. (2004). Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 74, 323-349.
- Mori, H., Hosoda, K., Matsubara, E., Nakamoto, T., Furiya, Y., Endoh, R., Usami, M., Shoji, M., Maruyama, S. und Hirai, S. (1995). Tau in cerebrospinal fluids: establishment of the sandwich ELISA with antibody specific to the repeat sequence in tau. *Neurosci. Lett.* 186, 181-183.
- Morrison, J. H. und Hof, P. R. (1997). Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278, 412-419.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Motter, R., Vigo-Pelfrey, C., Kholodenko, D., Barbour, R., Johnson-Wood, K., Galasko, D., Chang, L., Miller, B., Clark, C. und Green, R. (1995). Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 38, 643-648.
- Münter, L. M., Botev, A., Richter, L., Hildebrand, P. W., Althoff, V., Weise, C., Kaden, D. und Multhaup, G. (2010). Aberrant APP processing in hereditary forms of Alzheimer disease caused by APP-FAD mutations can be rescued by mutations in the APP GxxxG motif. *J. Biol. Chem.* 285, 21636-21643.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Notkola, I. L., Sulkava, R., Pekkanen, J., Erkinjuntti, T., Ehnholm, C., Kivinen, P., Tuomilehto, J. und Nissinen, A. (1998). Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17, 14-20.
- Olson, M. I. und Shaw, C. M. (1969). Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* 92, 147-156.
- Orlando, R., Kenny, P. T. und Zagorski, M. G. (1992). Covalent modification of Alzheimer's amyloid beta-peptide in formic acid solutions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 686-691.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10962-10966.

- Pappolla, M. A., Bryant-Thomas, T. K., Herbert, D., Pacheco, J., Fabra, G. M., Manjon, M., Girones, X., Henry, T. L., Matsubara, E., Zambon, D., Wolozin, B., Sano, M., Cruz-Sanchez, F. F., Thal, L. J., Petanceska, S. S. und Refolo, L. M. (2003). Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61, 199-205.
- Pettmann, B., Louis, J. C. und Sensenbrenner, M. (1979). Morphological and biochemical maturation of neurones cultured in the absence of glial cells. *Nature* 281, 378-380.
- Pike, K. E., Savage, G., Villemagne, V. L., Ng, S., Moss, S. A., Maruff, P., Mathis, C. A., Klunk, W. E., Masters, C. L. und Rowe, C. C. (2007). Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain* 130, 2837-2844.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K. und Horber, J. K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148, 997-1008.
- Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A. und Franklin, E. C. (1968). The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J. Clin. Invest* 47, 924-933.
- Radde, R., Bolmont, T., Käser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M. E., Jaggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Holscher, C., Mathews, P. M. und Jucker, M. (2006). Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940-946.
- Rajendran, L., Schneider, A., Schlechtingen, G., Weidlich, S., Ries, J., Braxmeier, T., Schwille, P., Schulz, J. B., Schroeder, C., Simons, M., Jennings, G., Knölker, H. J. und Simons, K. (2008). Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* 320, 520-523.
- Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., Duff, K. und Pappolla, M. A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* 7, 321-331.
- Refolo, L. M., Pappolla, M. A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S. D., Thomas-Bryant, T., Tint, G. S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S. S. und Duff, K. E. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 890-899.
- Resh, M. D. (2006). Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci. STKE.* 2006, re14.
- Ricchelli, F., Drago, D., Filippi, B., Tognon, G. und Zatta, P. (2005). Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of beta-amyloids. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1724-1733.
- Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I. und Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr. Biol.* 11, 1288-1293.
- Righetti, P. G. (2006). Real and imaginary artefacts in proteome analysis via two-dimensional maps. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 841, 14-22.
- Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S. und McConlogue, L. (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1317-1324.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K. und Tsuda, T. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.

- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R. J., Reardon, I. M., Zurcher-Neely, H. A., Heinrikson, R. L. und Ball, M. J. (1993). Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268, 3072-3083.
- Russo, C., Saido, T. C., DeBusk, L. M., Tabaton, M., Gambetti, P. und Teller, J. K. (1997). Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett.* 409, 411-416.
- Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y. und Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466.
- Saido, T. C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T. und Kawashima, S. (1996). Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176.
- Savonenko, A. V., Melnikova, T., Laird, F. M., Stewart, K. A., Price, D. L. und Wong, P. C. (2008). Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 5585-5590.
- Savva, G. M., Wharton, S. B., Ince, P. G., Forster, G., Matthews, F. E. und Brayne, C. (2009). Age, neuropathology, and dementia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2302-2309.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. und Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864-870.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M. und Demuth, H. U. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* 563, 191-196.
- Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Bohm, G. und Demuth, H. U. (2006). On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45, 12393-12399.
- Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., Funke, S. A., Schilling, S. und Demuth, H. U. (2009). Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* 48, 7072-7078.
- Schmitt, F. A., Davis, D. G., Wekstein, D. R., Smith, C. D., Ashford, J. W. und Markesbery, W. R. (2000). "Preclinical" AD revisited: neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology* 55, 370-376.
- Schwab, C., Hosokawa, M. und McGeer, P. L. (2004). Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* 188, 52-64.
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487-498.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81, 741-766.
- Selkoe, D. J. und Wolfe, M. S. (2007). Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 131, 215-221.
- Sergeant, N., Bombois, S., Ghestem, A., Drobecq, H., Kostanjevecki, V., Missiaen, C., Watzet, A., David, J. P., Vanmechelen, E., Sergheraert, C. und Delacourte, A. (2003). Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J. Neurochem.* 85, 1581-1591.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D. J., Lieberburg, I., und Schenk D. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327.

- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., Thal, L. J. und Lieberburg, I., und Schenk D. B. (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361, 260-263.
- Shapira, R., Austin, G. E. und Mirra, S. S. (1988). Neuritic plaque amyloid in Alzheimer's disease is highly racemized. *J. Neurochem.* 50, 69-74.
- Sheets, E. D., Holowka, D. und Baird, B. (1999). Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 95-99.
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J. und Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629-639.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A. R., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens J. M. und St George-Hyslop, H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shie, F. S., Jin, L. W., Cook, D. G., Leverenz, J. B. und LeBoeuf, R. C. (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13, 455-459.
- Shirahama, T. und Cohen, A. S. (1967). High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J. Cell Biol.* 33, 679-708.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B. und Younkin, S. G. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K. und Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest* 110, 597-603.
- Simons, M., Schwarzler, F., Lutjohann, D., von, B. K., Beyreuther, K., Dichgans, J., Wormstall, H., Hartmann, T. und Schulz, J. B. (2002). Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Neurol.* 52, 346-350.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. und John, V. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sipe, J. D. und Cohen, A. S. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* 130, 88-98.
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A. und Price, D. L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.
- Sisodia, S. S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 6075-6079.
- Sletten, K., Westermark, P. und Natvig, J. B. (1976). Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J. Exp. Med.* 143, 993-998.
- Small, S. A. und Gandy, S. (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron* 52, 15-31.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Spitzer, P., Herrmann, M., Klafki, H. W., Smirnov, A., Lewczuk, P., Kornhuber, J., Wiltfang, J. und Maler, J. M. (2010). Phagocytosis and LPS alter the maturation state of beta-amyloid precursor protein and induce different A β peptide release signatures in human mononuclear phagocytes. *J. Neuroinflammation.* 7, 59.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., Waridel, C., Calhoun, M. E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M. und Sommer, B. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287-13292.
- Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K. T., Friedman, D. L., Kimmel, L. H., Bergeson, J., Manetti, G. J., Zimmermann, M., Tang, B., Bartko, J. J. und Cohen, R. M. (2003). Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 289, 2094-2103.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T. E. und Younkin, S. G. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264, 1336-1340.
- Tagliavini, F., Giaccone, G., Frangione, B. und Bugiani, O. (1988). Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci. Lett.* 93, 191-196.
- Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K. und Ishiura, S. (2007). ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 111-117.
- Terry, R. D. (1963). The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 22, 629-642.
- Thinakaran, G. und Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615-29619.
- Vanderstichele, H., De Meyer, G., Andreasen, N., Kostanjevecki, V., Wallin, A., Olsson, A., Blennow, K. und Vanmechelen, E. (2005). Amino-truncated beta-amyloid42 peptides in cerebrospinal fluid and prediction of progression of mild cognitive impairment. *Clin. Chem.* 51, 1650-1660.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. und Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Vigo-Pelfrey, C., Seubert, P., Barbour, R., Blomquist, C., Lee, M., Lee, D., Coria, F., Chang, L., Miller, B. und Lieberburg, I. (1995). Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 45, 788-793.
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Younkin, S. G. und Golde, T. E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* 9, 11-23.
- Wang, Z., Nicholls, S. J., Rodriguez, E. R., Kummu, O., Horkko, S., Barnard, J., Reynolds, W. F., Topol, E. J., DiDonato, J. A. und Hazen, S. L. (2007). Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat. Med.* 13, 1176-1184.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.

- Westermarck, P. und Sletten, K. (1982). A serum AA-like protein as a common constituent of secondary amyloid fibrils. *Clin. Exp. Immunol.* 49, 725-731.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., De Strooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C. und Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
- Wiltfang, J., Arold, N. und Neuhoff, V. (1991). A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* 12, 352-366.
- Wiltfang, J., Smirnov, A., Schnierstein, B., Kelemen, G., Matthies, U., Klafki, H. W., Staufenbiel, M., Hüther, G., Rütger, E. und Kornhuber, J. (1997). Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18, 527-532.
- Wiltfang, J., Esselmann, H., Cupers, P., Neumann, M., Kretschmar, H., Beyermann, M., Schleuder, D., Jahn, H., Rütger, E., Kornhuber, J., Annaert, W., De Strooper, B. und Saftig, P. (2001). Elevation of beta-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J. Biol. Chem.* 276, 42645-42657.
- Wiltfang, J., Esselmann, H., Bibl, M., Smirnov, A., Otto, M., Paul, S., Schmidt, B., Klafki, H. W., Maler, M., Dyrks, T., Bienert, M., Beyermann, M., Rütger, E. und Kornhuber, J. (2002). Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J. Neurochem.* 81, 481-496.
- Wirths, O., Bethge, T., Marcello, A., Harmeier, A., Jawhar, S., Lucassen, P. J., Multhaup, G., Brody, D. L., Esparza, T., Ingelsson, M., Kalimo, H., Lannfelt, L. und Bayer, T. A. (2010). Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J. Neural Transm.* 117, 85-96.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G. und Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57, 1439-1443.
- Yagishita, S., Itoh, Y., Nan, W. und Amano, N. (1981). Reappraisal of the fine structure of Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol.* 54, 239-246.
- Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M. und Harigaya, Y. (1988). Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol.* 77, 113-119.
- Yamakawa, H., Yagishita, S., Futai, E. und Ishiura, S. (2010). beta-Secretase inhibitor potency is decreased by aberrant beta-cleavage location of the "Swedish mutant" amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 285, 1634-1642.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L. und Gurney, M. E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.
- Yumoto, S., Kakimi, S., Ohsaki, A. und Ishikawa, A. (2009). Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.* 103, 1579-1584.
- Zahs, K. R. und Ashe, K. H. (2010). 'Too much good news' - are Alzheimer mouse models trying to tell us how to prevent, not cure, Alzheimer's disease? *Trends Neurosci.* 33, 381-389.
- Zhang, J., Yan, H., Harding, J. J., Liu, Z. X., Wang, X. und Ruan, Y. S. (2008). Identification of the primary targets of carbamylation in bovine lens proteins by mass spectrometry. *Curr. Eye Res.* 33, 963-976.
- Zheng, H. und Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* 1,5.

- Zhu, M., Souillac, P. O., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A. und Fink, A. L. (2002). Surface-catalyzed amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.* 277, 50914-50922.

8. Publikationen

Publikationen zum Promotionsprojekt

Schieb H., Kratzin H.D., Jahn O., Möbius W., Staufenbiel M., Rabe S., Wiltfang J., Klafki H.W.

β -Amyloid peptide variants in APP23 mice: Comparison with Human Alzheimer's Amyloid and Evidence for High Susceptibility of the N-Terminus to Chemical Modification.

Manuskript in Vorbereitung

Schieb H., Weidlich S., Schlechtingen G., Linning P., Jennings G., Gruner M., Wiltfang J., Klafki H.W., Knölker H.J.

Structural design, solid phase synthesis and activity of membrane-anchored β -secretase inhibitors on A β formation from wild-type and Swedish-mutant APP.

Chemistry – A European Journal (2010), 16(48):14412-23.

Schieb H., Spitzer P., Riess V., Wiltfang J., Klafki H.W.

A method to prevent cross contamination during 2-DE by β -amyloid peptides.

Proteomics. (2010), 10(19): 3539-43

Weitere Publikationen

Spitzer P., **Schieb H.**, Kamrowski-Kruck H., Otto M., Chiasserini D., Parnetti L., Herukka S.K., Schuchhardt J., Wiltfang J., Klafki H.W.

Evidence for elevated cerebrospinal fluid ERK1/2 levels in Alzheimer's disease.

Eingereicht.

Lock P., I S.T., Straffon A.F., **Schieb H.**, Hovens C.M., Stylli S.S.

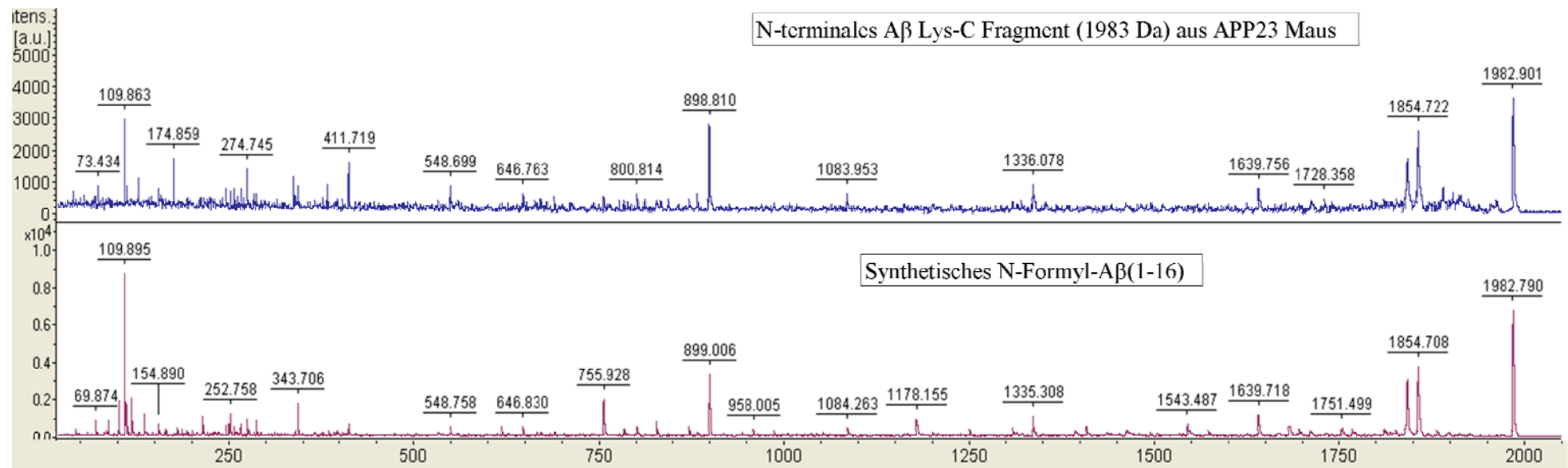
Spred-2 steady-state levels are regulated by phosphorylation and Cbl-mediated ubiquitination.

Biochemical and Biophysical Research Communications. (2006), 351(4):1018-23

9. Anhang

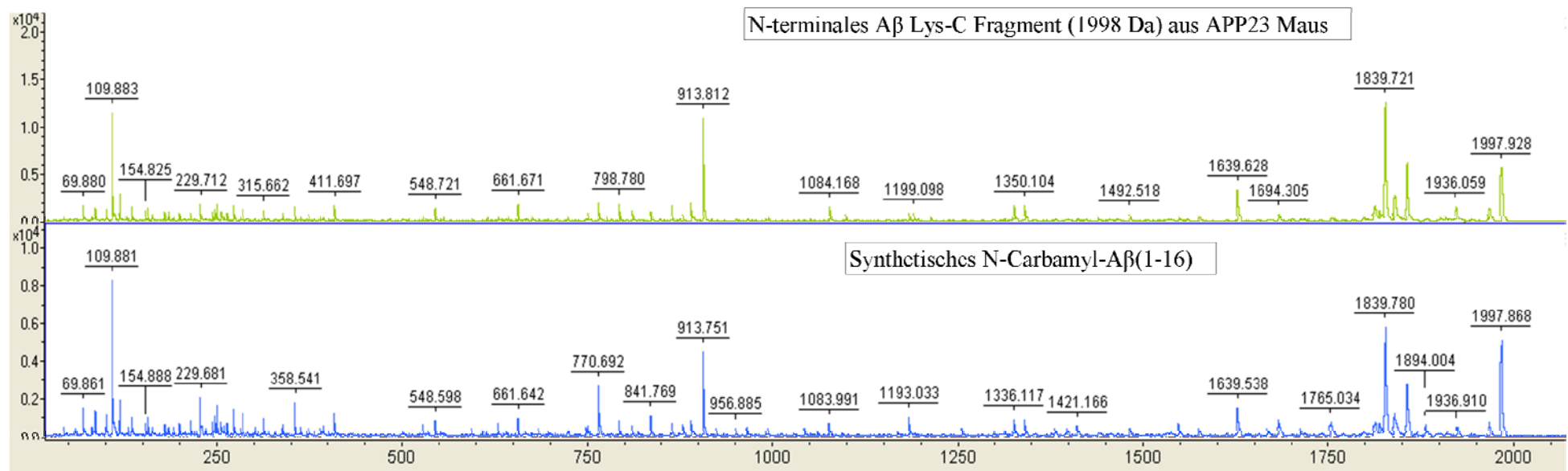
Anhang 1: Vergleich der MS/MS Spektren von dem N-terminalen A β Lys-C Fragment aus der APP23-Maus (1983 Da) mit dem synthetischen Peptid N-Formyl-A β (1-16).

Die Ameisensäure-Fraktion aus einer 24 Monate alten APP23 Maus wurde durch 2DE aufgetrennt. Der Spot, der in Höhe von A β (1-40) migrierte und dessen pI ca. 4,7 betrug (Spot 4 in Abb. 12, S. 58, und Tabelle 5, S.59) wurde mit Lys-C verdaut und das N-terminale Fragment 1-16, das eine Masse von 1983 Da aufwies, mit MS/MS analysiert (blaues Spektrum, oben). Synthetisches N-Formyl-A β (1-16) wurde durch „collision-induced-decay“ fragmentiert und ebenfalls durch MS/MS analysiert (rotes Spektrum, unten).



Anhang 2: Vergleich der MS/MS Spektren von dem N-terminalen A β Lys-C Fragment aus der APP23-Maus (1998 Da) mit dem synthetischen Peptid N-Carbamyl-A β (1-16).

Die Ameisensäure-Fraktion aus einer 24 Monate alten APP23 Maus wurde durch 2DE aufgetrennt. Der Spot, der in Höhe von A β (1-40) migrierte und dessen pI ca. 4,7 betrug (Spot 4 in Abb. 12, S.58, und Tabelle 5, S. 59) wurde mit Lys-C verdaut und das N-terminale Fragment 1-16, das eine Masse von 1998 Da aufwies, mit MS/MS analysiert (grünes Spektrum, oben). Synthetisches N-Formyl-A β (1-16) wurde durch „collision-induced-decay“ fragmentiert und ebenfalls durch MS/MS analysiert (blaues Spektrum, unten).



Danksagung

Großer Dank gilt Prof. Wiltfang für die langjährige Betreuung vor und während meiner Promotion, für seine ständige Hilfsbereitschaft und für die Denkanstöße, die er mir für meine Forschung gegeben hat.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Hans Klafki für die hervorragende intensive Betreuung, sein starkes Engagement und die vielen interessanten Diskussionen. Er hat erheblich dazu beigetragen, dass ich in den letzten drei Jahren eine Menge lernen konnte.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Prof. Ralf Küppers für die Übernahme des Erstgutachtens und für seine Hilfe zu allen Fragen bei der Fertigstellung der Promotion.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Hartmut Kratzin und seine Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen für die intensive, produktive Kooperation.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Knölker von der Technischen Universität Dresden für die spannende Kooperation und die interessanten Gespräche und hoffe, dass noch einige interessante Projekte aus der Achse Dresden - Essen hervorgehen werden.

Bei Dr. Matthias Staufenbiel möchte ich mich sehr für die Bereitstellung der APP23 Mausproben bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei allen Kollegen des Labors für Molekulare Neurobiologie in Essen, sowie den ehemaligen Kollegen der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie in Erlangen für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken. Danke an Hermann Esselmann, Andreas Henkel, Astridt Imlau, Heidrun Jablonski, Hans Klafki, Heike Kamrowski-Kruck, Sabine Lehmann, Piotr Lewczuk, Manuel Maler, Katharina Müller, Timo Oberstein, Martin Reichel, Cosima Rhein, Verena Riess, Philipp Spitzer und Philipp Tripal. Besonderer Dank geht hierbei an Heike Kamrowski-Kruck, die mir mit ihrem exzellenten Fachwissen und ihrer stetigen Hilfsbereitschaft eine große Stütze war.

Ein großer Dank gilt meinem Bruder und meinen Freunden aus Erlangen und Reutlingen, die trotz der Distanz immer für mich da waren.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinen Eltern aussprechen, die immer an mich glauben und immer wieder Talente in mir entdecken.

Einige in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern erzielt. Hierauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an entsprechender Stelle hingewiesen.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Amyloidablagerung in einem Mausmodell der Alzheimer Demenz und die Modulation der β -Amyloid-Peptidentstehung durch membranverankerte Inhibitoren“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Heinke Schieb befürworte.

Essen, den _____

Name des wissenschaftl.
Betreuers/Mitglieds der
Universität Duisburg-Essen

Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Heinke Schieb

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Heinke Schieb